



PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
JAKARTA

MODUL PRAKTIKUM INSTRUMENTASI

PENYUSUN:

ALMAWATI SITUMORANG, M.FARM., APT.

DR. SUPANDI, M.SI., APT.

SOFIA FATMAWATI, M.FARM., APT.

2019



PENGESAHAN

MODUL PRAKTIKUM INSTRUMENTASI

PENYUSUN:

ALMAWATI SITUMORANG, M.FARM., APT.

DR. SUPANDI, M.SI., APT.

SOFIA FATMAWATI, M.FARM., APT.

JAKARTA, 25 NOVEMBER 2019

KETUA PROGRAM STUDI FARMASI

KORI YATI, M.FARM., APT.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan kehadirat Allah SWT, atas berkah, rahmat dan hidayah-Nya. Penuntun praktikum ini dipergunakan pada praktikum Instrumentasi bagi mahasiswa Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. HAMKA, Jakarta. Penuntun Praktikum ini disusun untuk membantu dalam kegiatan pembelajaran analisa instrumentasi di Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. HAMKA, Jakarta.

Dalam pelaksanaan praktikum Instrumentasi, mahasiswa diwajibkan mengisi lembar kerja hasil praktikum yang telah disediakan. Diharapkan pula mahasiswa membaca beberapa literatur lain yang berkaitan dengan materi praktikum.

Kami sadari bahwa penuntun praktikum ini masih terdapat banyak kekurangan, dan jauh dari sempurna walaupun demikian kami mengharapakan penuntun ini dapat memberikan sumbangan bagi semua pihak.

Jakarta, September 2019

Penulis

DAFTAR ISI

<u>KATA PENGANTAR</u>	3
<u>DAFTAR ISI</u>	4
<u>TATA TERTIB PRAKTIKUM</u>	8
<u>DESKRIPSI MATA KULIAH PRAKTIKUM</u>	11
<u>PETUNJUK PENGGUNAAN MODUL PRAKTIKUM</u>	12
<u>PRAKTIKUM 1: PENDAHULUAN</u>	13
1. KOMPETENSI DASAR	13
2. INDIKATOR CAPAIAN	13
3. TUJUAN PRAKTIKUM	13
4. URAIAN TEORI	13
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	15
6. EVALUASI	15
7. SOAL LATIHAN	15
8. DAFTAR PUSTAKA	15
<u>PRAKTIKUM 2: SPEKTROFOTOMETER UV-VIS</u>	16
1. KOMPETENSI DASAR	16
2. INDIKATOR CAPAIAN	16
3. TUJUAN PRAKTIKUM	16
4. URAIAN TEORI	16
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	21
6. EVALUASI	21
7. SOAL LATIHAN	22
8. DAFTAR PUSTAKA	22
<u>PRAKTIKUM 3: PENGARUH PH TERHADAP BENTUK SPEKTRUM</u>	23
1. KOMPETENSI DASAR	23
2. INDIKATOR CAPAIAN	23
3. TUJUAN PRAKTIKUM	23
4. URAIAN TEORI	23
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	24

6. EVALUASI	25
7. SOAL LATIHAN	28
8. DAFTAR PUSTAKA	28
<u>PRAKTIKUM 4: UJI STABILITAS (OPERATING TIME/TIME SCANNING)</u>	<u>29</u>
1. KOMPETENSI DASAR	29
2. INDIKATOR CAPAIAN	29
3. TUJUAN PRAKTIKUM	29
4. URAIAN TEORI	29
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	30
6. EVALUASI	31
7. SOAL LATIHAN	33
8. DAFTAR PUSTAKA	33
<u>PRAKTIKUM 5: PENETAPAN KADAR SECARA SPEKTRIFOTOMETRI ULTRA VIOLET</u>	<u>34</u>
1. KOMPETENSI DASAR	34
2. INDIKATOR CAPAIAN	34
3. TUJUAN PRAKTIKUM	34
4. URAIAN TEORI	34
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	37
6. EVALUASI	38
7. SOAL LATIHAN	40
8. DAFTAR PUSTAKA	40
<u>PRAKTIKUM 6: PENETAPAN KADAR SECARA SPEKTRIFOTOMETRI VISIBEL</u>	<u>41</u>
1. KOMPETENSI DASAR	41
2. INDIKATOR CAPAIAN	41
3. TUJUAN PRAKTIKUM	41
4. URAIAN TEORI	41
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	41
6. EVALUASI	43

7. SOAL LATIHAN	45
8. DAFTAR PUSTAKA	46
<u>PRAKTIKUM 7: PENETAPAN KADAR CAMPURAN</u>	<u>47</u>
1. KOMPETENSI DASAR	47
2. INDIKATOR CAPAIAN	47
3. TUJUAN PRAKTIKUM	47
4. URAIAN TEORI	47
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	47
6. EVALUASI	49
7. SOAL LATIHAN	60
8. DAFTAR PUSTAKA	60
<u>PRAKTIKUM 8: SPEKTROSKOPI SERAPAN ATOM</u>	<u>61</u>
1. KOMPETENSI DASAR	61
2. INDIKATOR CAPAIAN	61
3. TUJUAN PRAKTIKUM	61
4. URAIAN TEORI	61
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	64
6. EVALUASI	67
7. SOAL LATIHAN	70
8. DAFTAR PUSTAKA	70
<u>PRAKTIKUM 9: SPEKTROSKOPI INFRA MERAH</u>	<u>71</u>
1. KOMPETENSI DASAR	71
2. INDIKATOR CAPAIAN	71
3. TUJUAN PRAKTIKUM	71
4. URAIAN TEORI	71
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	78
6. EVALUASI	80
7. SOAL LATIHAN	83
8. DAFTAR PUSTAKA	83
<u>PRAKTIKUM 10: KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI</u>	<u>84</u>
1. KOMPETENSI DASAR	84

2. INDIKATOR CAPAIAN	84
3. TUJUAN PRAKTIKUM	84
4. URAIAN TEORI	84
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	98
6. EVALUASI	99
7. SOAL LATIHAN	104
8. DAFTAR PUSTAKA	104
<u>PRAKTIKUM 11: KROMATOGRAFI GAS / GC</u>	<u>105</u>
1. KOMPETENSI DASAR	105
2. INDIKATOR CAPAIAN	105
3. TUJUAN PRAKTIKUM	105
4. URAIAN TEORI	105
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	106
6. EVALUASI	108
7. SOAL LATIHAN	111
8. DAFTAR PUSTAKA	111
<u>PRAKTIKUM 12: SDS-PAGE (SDS POLYACRILAMIDE GEL ELEKTROFORESIS)</u>	<u>112</u>
1. KOMPETENSI DASAR	112
2. INDIKATOR CAPAIAN	112
3. TUJUAN PRAKTIKUM	112
4. URAIAN TEORI	112
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	113
6. EVALUASI	117
7. SOAL LATIHAN	120
8. DAFTAR PUSTAKA	120

TATA TERTIB PRAKTIKUM

Mahasiswa yang diperkenankan melakukan praktikum adalah mereka yang terdaftar secara akademik, yang selanjutnya disebut sebagai **Praktikan**.

1. Praktikan wajib hadir 10 menit sebelum praktikum dimulai, keterlambatan lebih dari 10 menit sejak praktikum dimulai, praktikan dianggap tidak hadir.
2. Jika berhalangan hadir, praktikan harus dapat memberikan keterangan tertulis kepada dosen pengampu praktikum terkait dengan alasan ketidakhadirannya.
3. Praktikan seperti no. 2 di atas, jika akan mengganti praktikum pada hari lain, wajib meminta rekomendasi tertulis terlebih dahulu dari koordinator pengampu praktikum.
4. Gunakan sepatu tertutup yang layak untuk keamanan bekerja di laboratorium. Sepatu terbuka, sandal atau sepatu hak tinggi **TIDAK BOLEH** digunakan di laboratorium.
5. Praktikan memasuki ruang laboratorium dengan telah mengenakan jas praktikum.
6. Rambut yang panjang harus selalu diikat dan dimasukkan ke dalam jas lab untuk menghindari kontak dengan zat-zat berbahaya, mesin yang bergerak dan nyala api.
7. Praktikan wajib membawa: laporan, lembar kerja praktikum, masker, dan alat-alat yang dibutuhkan pada saat praktikum.
8. Sewaktu-waktu Dosen dapat mengadakan *Pre Test* atau *Post Test*, untuk materi-materi yang akan atau yang telah dikerjakan.
9. Praktikan tidak diperbolehkan makan, minum, dan atau merokok di dalam laboratorium selama praktikum berlangsung
10. Praktikan tidak diperbolehkan bersenda gurau yang mengakibatkan terganggunya kelancaran praktikum

Sanksi terhadap pelanggaran tata tertib no.8 dan9 diatas adalah dikeluarkan dari laboratorium atau tidak diperkenankan melanjutkan praktikum.

11. Praktikkan bertanggung jawab atas peralatan yang dipinjamnya, kebersihan meja masing-masing, serta lantai disekitarnya.
12. Setelah menggunakan *reagen*, praktikkan wajib meletakkan kembali pada tempat semula.
13. Pilihlah tempat yang tepat untuk melakukan percobaan. Percobaan yang melibatkan zat-zat berbahaya dan beracun harus dilakukan di dalam lemari asam.
14. **JANGAN MEMBUANG** zat-zat kimia ke wasbak!
15. Jika Anda terkena zat kimia, segeralah cuci dengan sabun dan bilaslah dengan air yang banyak. Kecuali apabila anda terkena tumpahan/cipratan brom, fenol atau asam sulfat pekat (H_2SO_4 pekat), **HINDARI MEMBILAS DENGAN AIR!!!**
16. Jika Anda terluka atau mengalami kecelakaan di laboratorium, beritahu segera dosen atau asisten praktikum. Segera hubungi pihak medis jika lukanya cukup serius
17. Cek semua peralatan sebelum digunakan. Apabila terdapat kerusakan, segera laporkan kepada petugas laboratorium untuk segera diganti/diperbaiki
18. **JANGAN PERNAH** melakukan pekerjaan, penyiapan sampel atau percobaan **TANPA ADANYA PENGAWASAN** supervisor laboratorium (dosen atau asisten praktikum,).
19. Jika akan meninggalkan ruang laboratorium, praktikkan wajib meminta ijin kepada dosen
20. **JANGAN** meninggalkan suatu percobaan tanpa pengawasan, terutama percobaan yang menggunakan bahan-bahan yang mudah meledak atau mudah terbakar.
21. Praktikkan melakukan analisis sesuai bagiannya masing-masing, mencatat hasilnya pada lembar kerja praktikum, serta memintakan "ACC" pada dosen

22. Lakukan selalu pengecekan terhadap hal-hal yang menunjang keselamatan kerja setiap kali selesai percobaan. **PASTIKAN** semua keran gas, keran air, saluran listrik, saluran telah dimatikan
23. Perhiasan, *Hand Phone* dan barang berharga lain merupakan tanggung jawab masing-masing praktikan.
24. Mahasiswa tidak diperkenankan menggunakan/bermain *Hand Phone* pada saat jam praktikum sedang berlangsung.
25. **KENALI** lokasi-lokasi dan cara pengoperasian fasilitas keselamatan kerja dan keadaan darurat, seperti pemadam kebakaran, kotak P3K, alarm kebakaran, pintu darurat, dsb
26. Selalu cuci tangan dan lengan Anda sebelum meninggalkan laboratorium.

DESKRIPSI MATA KULIAH PRAKTIKUM

Praktikum Analisa Instrumentasi merupakan mata kuliah wajib untuk mahasiswa program studi Farmasi di Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA. Perkuliahan praktikum ini bertujuan untuk memberikan pemahaman tentang dasar-dasar analisis instrumentasi, prinsip kerja instrumentasi dan komponen utamanya serta melatih menginterpretasikan data hasil analisis instrumental. Lingkup perkuliahan meliputi teknik-teknik analisis spektrometri (UV-VIS, Infra Merah, spektroskopi Serapan Atom), teknik pemisahan moderen (HPLC, GC) dan SDS PAGE.

Perkuliahan Praktikum ini disajikan dalam bentuk ceramah, Praktek, diskusi, dan simulasi dengan memanfaatkan fasilitas ICT (*Information Communication Technology*). Hasil perkuliahan ini akan diukur melalui pre test, post test, ujian tengah semester, ujian akhir semester, tugas-tugas, laporan dan partisipasi dalam diskusi.

PETUNJUK PENGGUNAAN MODUL PRAKTIKUM

Untuk memperoleh hasil praktikum dan belajar yang maksimal dalam menggunakan modul ini, maka langkah-langkah yang perlu dilaksanakan antara lain:

1. Bacalah dan pahami secara seksama uraian materi yang ada pada masing-masing kegiatan praktikum
2. Kerjakan tugas formatif (soal latihan) untuk mengetahui seberapa pemahaman saudara terhadap materi yang akan dikerjakan
3. Untuk kegiatan praktikum, perhatikan hal-hal berikut:
 - a. Perhatikan petunjuk keselamatan
 - b. Pahami setiap langkah praktikum
 - c. Sebelum melaksanakan praktikum, identifikasi alat –alat dan bahan yang akan dipergunakan dengan cermat
 - d. Gunakan alat sesuai dengan instruksi kerja alat/prosedur kerja alat dengan benar
 - e. Untuk kegiatan praktikum yang belum dipahami dengan jelas, minta izin dosen, asisten atau laboran terlebih dahulu
 - f. Setelah selesai praktikum, kembalikan alat dan bahan ke tempat semula.
4. Jika belum memahami materi yang akan dikerjakan bertanyalah kepada dosen pengampu praktikum

PRAKTIKUM 1: PENDAHULUAN

1. Kompetensi Dasar

- a. Klasifikasi teknik dan metode instrumen
- b. Kesalahan metode analisa

2. Indikator Capaian

- a. mampu menyebutkan konsep dan pengertian Analisa Instrumen.
- b. mampu menyebutkan Klasifikasi teknik, aplikasi dari metode instrumen

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami konsep dan pengertian Analisa Instrumen

4. Uraian Teori

Ilmu kimia adalah salah satu cabang dari ilmu pengetahuan yang mempelajari materi atau zat dalam hal susunan sifat-sifat dan perubahannya. Kimia analisa merupakan salah satu cabang dari ilmu kimia yang mengembangkan atau mendasari diri pada bagian yang pertama yaitu mempelajari materi atau zat dari segi susunannya.

Ada dua macam pekerjaan yang dilakukan pada kimia analisa yaitu analisa kualitatif dan kuantitatif yang berkembang dari kimia analisa visual sampai ke arah yang modern yaitu analisa instrumental. Analisis kimia instrumen dikenal juga sebagai analisis fisiko-kimia dalam analisa ini ditentukan sifat-sifat fisiko-kimia dari molekul atau atom dari sampel yang dianalisis.

Teknik Analisa modern mencakup berbagai teknik analisis instrumen elektronika yang dikembangkan untuk mengukur parameter fisika dan kimia alami yang khas dan tetap dari atom atau molekul. Parameter khas yang bermakna untuk analisis adalah absorpsi, emisi energi radiasi elektromagnet oleh atom dan molekul. Radiasi elektromagnet yang berinteraksi dengan spesi analit memberikan sinyal kepada *input transducer* yang dapat diukur, dikuatkan, dikonversikan ke

AC dan DC, diubah fasenya, disaring, dilakukan operasi matematika di dalam rangkaian pengubah sinyal (*signal modifier*) elektronika dari instrumen hingga menghasilkan informasi analisis yang bermakna.

Kesahihan analisa instrumental didukung oleh kecermatan, ketelitian, keterulangan, sensitivitas, kelurusan, kepemilahan, kemantapan atau ketahanan dan kestabilan dari metode yang dipakai. Walaupun pada penentuan molekul atau atom yang dianalisis dengan instrumen modern, hasil yang didapat tidak terlepas dari galat yang sistematis dan tidak sistematis.

Klasifikasi Teknik dan Metode Analisis Instrumental

A. Teknik Spektroskopik

1. Spektrofotometri UV-Vis
2. Spektrofotometri Infra Merah
3. Spektrofotometri Fluoresensi dan fosforesensi
4. Spektrofotometri Serapan Atom
5. Spektrofotometri Raman
6. Spektrofotometri resonansi magnet inti
7. Spektrofotometri radio kimia
8. Spektrofotometri sinar X
9. Spektrofotometri resonansi putaran electron

B. Teknik Kromatografik

1. Kromatografi Gas Cair dan Padat
2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
3. Kromatografi elusi CO₂ pada temperatur super kritik
4. Kromatografi planar

C. Teknik Elektrokimia

1. Potensiometri
2. Voltametri
3. Coulometri
4. Elektrogravimetri
5. Amferometri dan biamferometri

D. Teknik berbagai fenomena ilmiah

1. Analisis termik
2. Spektrometri massa
3. Kinetika reaksi

E. Teknik Terpadu

1. GC/FT-IR/MS
2. HPLC/FT-IR/MS
3. MS-MS

Klasifikasi tersebut di atas disusun atas dasar urutan kegunaan instrumen analisis dalam laboratorium analisis.

5. Pelaksanaan Praktikum

Ceramah dan diskusi

6. Evaluasi

Pre test dan post test

7. Soal Latihan

- a. Apa yang dimaksud dengan analisis Instrumentasi
- b. Apa perbedaan teknik spektroskopi dan kromatografi
- c. Apa perbedaan teknis analisis konvensional dan modern

8. Daftar Pustaka

- a. Mulja H.M dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumenta*. Surabaya: Airlangga University Press.
- b. Skoog, Douglas A. & Donald M. West, *Principles of Instrumental Analysis*, 1971, Holt, Rinehart & Wiston, Inc., United States of America
- c. Stahl E. Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi. diterjemahkan oleh Padmawinata K, Soediro I, Penerbit ITB, 1985. Bandung.

PRAKTIKUM 2: SPEKTROFOTOMETER ULTRA VIOLET-VISIBEL

1. Kompetensi Dasar

- a. Memahami Spektrofotometri UV dan visibel
- b. Memahami prinsip kerja Spektrofotometri UV dan visibel
- c. Memahami cara Analisis kualitatif dan kuantitatif dengan Spektrofotometri UV dan visibel

2. Indikator Capaian

- a. Mampu menjelaskan prinsip kerja Spektrofotometri UV dan visible
- b. Mampu melakukan Analisis kualitatif dan kuantitatif dengan Spektrofotometri UV dan visibel

3. Tujuan Praktikum

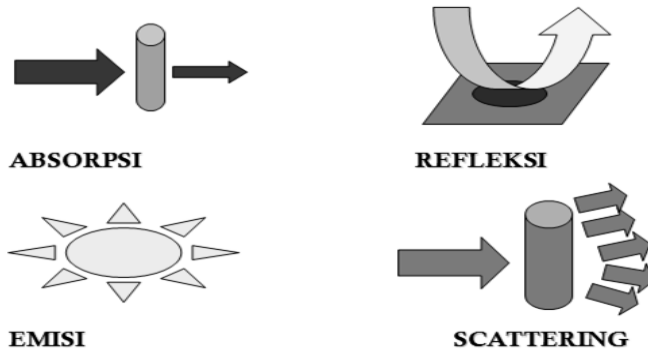
Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami dan mengetahui Spektrofotometri UV dan visibel

4. Uraian Teori

Spektroskopi adalah ilmu yang mempelajari interaksi antara gelombang elektromagnetik dengan materi. Sedangkan Teknik spektroskopik adalah salah satu analisis fisiko kimia yang mengamati tentang interaksi materi (atom atau molekul) dengan radiasi elektromagnetik (REM). Molekul-molekul dapat mengabsorpsi atau mentransmisi radiasi gelombang elektromagnetik. Berkas cahaya putih adalah kombinasi semua panjang gelombang spektrum tampak. Perbedaan warna yang kita lihat sebenarnya ditentukan dengan bagaimana gelombang cahaya tersebut diabsorpsi dan ditransmisikan (dipantulkan) oleh objek atau suatu larutan.

Interaksi REM dengan molekul akan menghasilkan satu atau dua macam dari tiga kejadian yang mungkin terjadi sebagai akibat interaksi atom molekul dengan REM adalah hamburan (*scattering*), absorpsi (*absorbtion*) dan emisi (*emission*) REM oleh atom atau molekul yang diamati.

Bentuk Interaksi Radiasi dengan Materi



Teknik spektroskopik berdasarkan sampel yang dianalisis dibagi menjadi dua jenis, yaitu: Spektroskopi Molekuler dan Spektroskopi Atomik. Spektroskopi Molekuler yang biasa digunakan untuk analisa struktural/*molecular* terdiri dari 4 teknik, yaitu: Spektroskopi Ultraviolet (UV), Spektroskopi Infrared (IR), Spektroskopi, dan Spektroskopi Massa. Sedangkan Spektroskopi Atomik yang dikenal adalah Spektroskopi Serapan Atom, Spektroskopi Emisi Atom dan Spektroskopi Fluoresensi Atom.

Pada teknik spektroskopik ada dua macam instrumen yaitu spektrometer dan spektrofotometer. Spektrometer menggunakan monokromator celah yang tetap pada bidang fokal, sedangkan spektrofotometer adalah spektrometer yang dilengkapi dengan detektor yang bersifat foto elektrik. Dalam bidang farmasi, analisa menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dikenal sebagai metode utama, baik untuk identifikasi, pemeriksaan kemurnian maupun untuk penetapan kadar.

Spektrofotometer digunakan untuk mengukur jumlah cahaya yang diabsorpsi atau ditransmisikan oleh molekul-molekul di dalam larutan. Ketika panjang gelombang cahaya ditransmisikan melalui larutan, sebagian energi cahaya tersebut akan diserap (*diabsorpsi*). Besarnya kemampuan molekul-molekul zat terlarut untuk mengabsorpsi cahaya pada pada panjang gelombang tertentu dikenal dengan istilah *absorbansi* (A), yang setara dengan nilai konsentrasi larutan tersebut dan panjang berkas cahaya yang dilalui

4. Intensitas sumber cahaya dan *amplifier* dari detektor berubah-ubah karena tegangan tidak stabil
5. Pada disosiasi kesetimbangan kimia berubah, misalnya pada perubahan pH larutan.
6. larutan berfluoresensi
7. Suhu larutan berubah selama pengukuran.

Spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari spektrofotometer dengan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Kelebihan Spektrofotometer dibandingkan fotometer adalah panjang gelombang dari sinar putih lebih terseleksi, diperoleh dengan alat pengurai seperti prisma, *grating* atau celah optis. Suatu Spektrofotometer tersusun dari sumber spektrum tampak yang kontinyu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blangko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blangko ataupun perbandingan.

Spektrofotometer digunakan untuk mengukur jumlah cahaya yang diabsorpsi atau ditransmisikan oleh molekul-molekul di dalam larutan. Ketika panjang gelombang cahaya ditransmisikan melalui larutan, sebagian energi cahaya tersebut akan diserap (*diabsorpsi*). Besarnya kemampuan molekul-molekul zat terlarut untuk mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang tertentu dikenal dengan istilah *absorbansi* (*A*), yang setara dengan nilai konsentrasi larutan tersebut dan panjang berkas cahaya yang dilalui (biasanya 1 cm dalam spektrofotometer) ke suatu point dimana persentase jumlah cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi diukur dengan phototube.

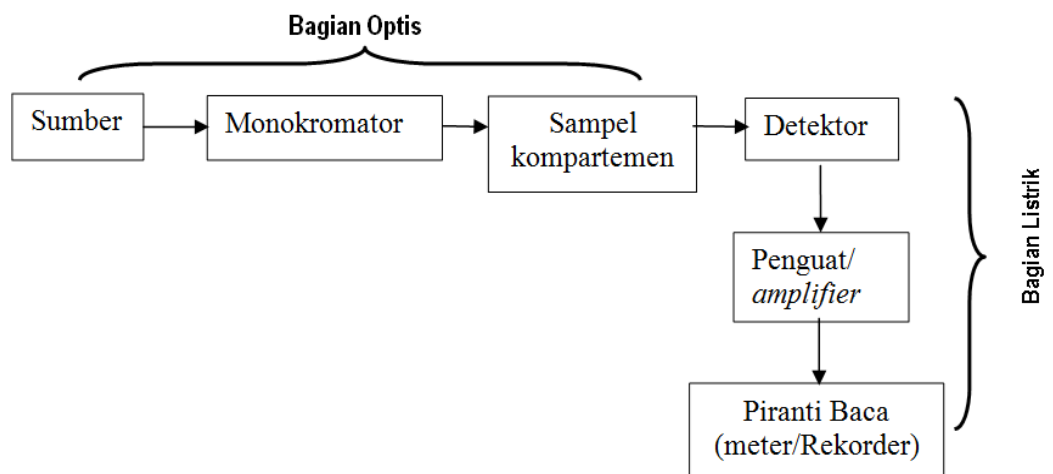
Sebuah spektrofotometer memiliki lima bagian penting yaitu:

1. *Sumber cahaya*, untuk UV umumnya digunakan lampu deuterium (D_2O), untuk visible digunakan lampu tungstent xenon (*Auc*).
2. *Monokromator*, suatu alat yang berfungsi mengubah cahaya polikromatik menjadi cahaya monokromatik
3. *Sel penyerap* / wadah pada sample, cell dalam spektrofotometer disebut juga dengan kuvet.

4. *Photodetektor* berfungsi untuk mengubah energi cahaya menjadi energi listrik
5. *Analyzer* (pengolah data), untuk spektrofotometer modern biasanya dilengkapi dengan komputer.

A. INSTRUMENTASI

Berikut komponen-komponen yang penting sekali dari suatu spektrofotometer UV-Vis.



Suatu spektrofotometer terdiri dari bagian-bagian utama sebagai berikut:

1. Sumber Cahaya (*Source*)
 - a. Radiasi Ultra Violet, sumber cahaya yang dipakai umumnya adalah lampu Hidrogen atau lampu Deuterium, memancarkan radiasi kontinyu pada daerah sekitar 190-380 nm
 - b. Radiasi cahaya tampak (*Visible Radiation*) merupakan campuran filamen tungsten dan gas iodine (Halogen) yang disebut juga sebagai sumber radiasi “tungsten-iodine”. Sumber radiasi ini bekerja pada panjang gelombang 380-900 nm.
2. Monokromator

Monokromator berfungsi untuk mendapatkan radiasi monokromatis dari sumber radiasi yang memancarkan radiasi polikromatis. Monokromator pada spektrofotometer UV-Vis biasanya terdiri dari susunan:

- a. celah masuk (*Entrance Slit*) tempat masuknya radiasi dari sumber cahaya
 - b. “*Collimating device*” berupa lensa atau cermin untuk menyejajarkan cahaya.
 - c. Alat dispersi berupa prisma (*grating*) untuk menguraikan radiasi atau bagian-bagian panjang gelombang.
 - d. Lensa atau cermin untuk memfokuskan cahaya
 - e. Celah keluar (*Exit slit*) tempat keluarnya radiasi yang hampir monokromatis menuju sampel (zat peresap).
3. Sel Peresap (*Sample Compartment*)
Sampel yang diperiksa pada daerah cahaya tampak dan ultraviolet biasanya larutan atau gas yang dimasukkan dalam sel (*cuvettes*).
 4. Detektor
Detektor yang digunakan adalah “*fotomultiplier tube*” yang menggunakan lapisan tipis dari semikonduktor senyawa logam alkali yang mudah melepaskan elektron. Detektor yang paling banyak digunakan adalah *fotomultiplier tube*.
 5. Penguat/ *amplifier*
Suatu piranti yang berfungsi untuk memperbesar arus yang dihasilkan oleh detektor agar dapat dibaca oleh rekorder.
 6. Meter atau rekorder
Signal elektronis yang dihasilkan oleh detektor harus diubah menjadi bentuk yang dapat diinterpretasikan. Suatu sistem baca (piranti pembaca) yang menginterpretasikan besarnya sinyal listrik, dinyatakan dalam bentuk % Transmittan (% T) maupun Adsorbansi (A).

5. Pelaksanaan Praktikum

Ceramah dan diskusi

6. Evaluasi

Pre test dan post test

7. Soal Latihan

- a. Gambarkan prinsip peralatan Spektrometer UV?
- b. Informasi apa sajakah yang dapat dihasilkan dari pengukuran sample dengan Spektrometer UV?
- c. Apakah semua jenis sample (padat, cair dan gas) dapat dilakukan pengukuran secara langsung dengan Spektrometer UV? Jelaskan!
- d. Jelaskan apakah yang dimaksud dengan Spektrometer Visible berkas tunggal ?
- e. Jelaskan apakah yang dimaksud dengan Spektrometer UV Double Beam ?

8. Daftar Pustaka

- a. Anonim, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, Depkes RI, 1995, Jakarta.
- b. Mulja H.M dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumenta*. Surabaya: Airlangga University Press.
- c. Gholib, Ibnu dan Rohman, Abdul. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- d. Khopkar. S. M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.

PRAKTIKUM 3: PENGARUH PH TERHADAP BENTUK SPEKTRUM

1. Kompetensi Dasar

- a. Memahami gugus Kromofor dan Auksokrom dari senyawa
- b. Memahami jenis dan macam-macam pelarut yang dapat mempengaruhi bentuk spektrum.

2. Indikator Capaian

Mahasiswa memahami pengaruh pH terhadap bentuk spektrum UV-Vis

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami pemilihan jenis dan macam-macam pelarut yang dapat mempengaruhi bentuk spektrum.

4. Uraian Teori

ANALISIS KUALITATIF

Analisa kualitatif dengan metode spektrofotometri Uv-Vis hanya dipakai sebagai data sekunder saja atau data pendukung. Data yang diperoleh dari spektroskopi UV dan Vis adalah panjang gelombang maksimal, intensitas, efek, pH, dan pelarut yang kesemuanya dapat dibandingkan dengan data yang sudah dipublikasikan

Pada analisis kualitatif dengan metode spektrofotometri Uv-Vis ada 2 hal yang dapat ditentukan, yaitu:

1. Pemeriksaan kemurnian spektrum UV-Vis
2. Penentuan panjang gelombang maksimum

Pada pemeriksaan kemurnian spektrum dilakukan dengan membandingkan spektrum dengan Pembanding (*Standard Reference*), namun metode ini tidak banyak memberikan hasil yang memuaskan dan tidak valid.

Hampir semua senyawa dapat menyerap energi cahaya UV. Perbedaan struktur atom/senyawa memberikan perbedaan besarnya energi yang diserap. Pola serapan UV suatu senyawa sangat spesifik → kualitatif, dapat

menyebabkan pergeseran pola spektrum. Struktur spektrum dapat berubah karena perbedaan lingkungan larutan → pergeseran. Pola pergeseran yang spesifik bisa dipakai untuk referensi kualitatif gugus/ senyawa tertentu. Panjang gelombang maksimum suatu senyawa bisa diprediksikan berdasarkan struktur senyawa

Karakteristik resapan suatu zat dalam pelarut tertentu, yaitu panjang gelombang pada resapan maksimum dan daya resapnya. Panjang gelombang pada resapan maksimum dapat ditentukan dengan membuat spektrum peresapan dari larutan yang diperiksa, ini dapat dilakukan dengan mencatat resapan sepanjang daerah panjang gelombang tertentu dengan menggunakan rekorder.

Faktor-faktor yang mempengaruhi spektrum peresapan antara lain: pelarut, kadar larutan, tebal larutan dan lebar celah. Data spektra UV-Vis secara tersendiri tidak dapat digunakan untuk identifikasi kualitatif obat atau metabolitnya. Data yang diperoleh dari spektroskopi UV-Vis adalah panjang gelombang maksimal, intensitas, efek pH dan pelarut. Dimana data-data tersebut dibandingkan dengan data yang ada dan telah dipublikasikan.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

- standar Vitamin B1, dll
- standar Asam salisilat
- NaOH pH 9 dan 13
- HCl pH 2 dan 5
- $\text{FeCl}_3/\text{FeNO}_3$
- Spektrofotometer UV-Vis
- alat-alat gelas
- Timbangan Analitik

b. Prosedur Kerja

1). Pembuatan Spektrum (UV)

- Timbang seksama 100,0 mg standar Vitamin B1, masukkan dalam labu tentukur 100-ml, larutkan aquadest sampai tanda batas (larutan Baku primer/Induk),
- pipet 2,0 ml dari larutan induk masukkan dalam labu tentukur 100-ml, encerkan dengan aquadest (cek pH air harus 7)

- lakukan hal yang sama pada Vitamin B1 dengan pelarut NaOH pH 9 dan 13 dan HCl pH 2 dan 5
- Ukur serapan dari masing masing larutan yang berbeda pH dengan Spektrofotometer.
- **Catatan:** Untuk sampel daerah Ultra Violet dapat digunakan Vitamin B1, Vitamin B6, Vitamin C, CTM, Kloramfenikol, tetrasiklin, Isoniazid, dan atau parasetamol.

2) Pembuatan Spektrum Visibel

- Timbang seksama 100,0 mg standar Asam Salisilat, masukkan dalam labu tentukur 100-ml, larutkan etanol 1 ml kemudian larutkan dengan aquadest sampai tanda batas (larutan Baku primer/Induk),
- pipet 2,0 ml dari larutan induk masukkan dalam labu tentukur 100-ml, encerkan dengan aquadest.
- lakukan hal yang sama pada Vitamin B1 dengan pelarut NaOH pH 9 dan 13 dan HCl pH 2 dan 5
- Tambahkan pereaksi warna $\text{FeCl}_3 / \text{FeNO}_3$
- Ukur serapan dengan Spektrofotometer pada daerah sinar tampak

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

Bahas bentuk spektrum berdasarkan adanya gugus kromofor dan auksokromnya dengan memperhatikan struktur dari sampel yang dianalisa. perhatikan pengaruh kelarutan dan pH pelarut.

c. **Laporan** (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Apakah pelarut dapat mempengaruhi hasil pengukuran dengan metode spektrofotometri UV ?
- b. Jelaskan tentang Auksokrom dan Kromofor
- c. J elaskan semua kemungkinan transisi elektronik yang terjadi di dalam interaksi suatu materi dengan sinar UV?
- d. Apakah syarat yang diperlukan agar suatu sample dapat dilakukan pengukuran dengan metode spektrofotometri UV ?
- e. Jelaskan apakah syarat pelarut yang baik untuk analisis dengan Spektrometer UV ?

8. Daftar Pustaka

- a. Anonim, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, Depkes RI, 1995, Jakarta.
- b. Mulja H.M dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumenta*. Surabaya: Airlangga University Press.
- c. Gholib, Ibnu dan Rohman, Abdul. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- d. Khopkar. S. M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.

PRAKTIKUM 4:
OPERATING TIME/TIME SCANNING

1. Kompetensi Dasar

- a. Memahami kestabilan zat aktif di dalam pelarut
- b. Memahami faktor-faktor yang mempengaruhi kestabilan zat aktif dalam pelarut.

2. Indikator Capaian

Mampu menjelaskan faktor-faktor yang mempengaruhi kestabilan zat aktif dalam pelarut

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami Uji Stabilitas (*Operating Time/Time Scanning*)

4. Uraian Teori

Operating time digunakan untuk mengukur waktu hasil reaksi atau pembentukan warna. Tujuannya adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Dibuat kurva baku antara serapan dan waktu. Pemilihan Panjang Gelombang Serapan Maksimum, panjang gelombang yang digunakan untuk analisis pada *operating time* adalah panjang gelombang yang mempunyai serapan maksimum. Dibuat kurva hubungan serapan dan waktu dari larutan.

Waktu operasional atau *operating time* merupakan waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk bereaksi dengan senyawa lain hingga terbentuk senyawa produk yang stabil. Kestabilan senyawa produk diketahui dengan mengamati absorbansi mulai dari saat direaksikan hingga tercapai serapan yang stabil. Pengukuran serapan ini dilakukan pada panjang gelombang maksimal teoritis

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

- Baku Vitamin B1, B6, Ctm, dll
- Spektrofotometer UV-Vis
- Baku Asam salisilat
- Pipet Volume
- FeCl₃/FeNO₃
- Labu tentukur
- alat-alat gelas
- botol Semprot
- Aquadest/etanol

b. Prosedur Kerja

1). Pembuatan Spektrum Vitamin B1 dan *Time Scanning*

- Timbang seksama 100,0 mg standar Vitamin B1, masukkan dalam labu tentukur 100-ml, larutkan aquadest sampai tanda batas (larutan Baku primer/Induk). Sesuaikan pelarut yang digunakan dengan literatur/buku standar.
- pipet 2,0 ml dari larutan induk masukkan dalam labu tentukur 100-ml, encerkan dengan aquadest
- Ukur serapan dengan Spektrofotometer Uv-Vis
- Dari Spektrum diperoleh λ maksimumnm
- Lakukan *Time Scanning* pada λ maksimumnya selama 20 menit

2). Pembuatan Spektrum Asam Salisilat dan *Time Scanning*

- Timbang seksama 100,0 mg standar Asam Salisilat, masukkan dalam labu tentukur 100-ml, larutkan dengan etanol larutkan dengan aquadest sampai tanda batas (larutan Baku primer/Induk). Pipet 2,0 ml dari larutan induk masukkan dalam labu tentukur 100-ml, encerkan dengan aquadest
- Tambahkan pereaksi FeCl₃ /FeNO₃
- Ukur serapan dengan Spektrofotometer Uv-Vis
- Dari spektrum diperoleh λ maksimumnm
- Lakukan *Time Scanning* pada λ maksimumnya selama 20 menit

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

Amati hubungan dari grafik Absorban terhadap waktu analisa, hitung standar deviasi absorban per waktu. Beri kesimpulan kestabilan sampel yang saudara praktekan terhadap pelarut yang digunakan.

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Bagaimanakah prinsip pengukuran kualitatif suatu sample dengan metode spektrofotometri UV ?
- b. Apakah cirri khas senyawa organik yang dapat mengabsorbsi sinar UV?

8. Daftar Pustaka

- a. Anonim, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, Depkes RI, 1995, Jakarta.
- b. Mulja H.M dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumenta*. Surabaya: Airlangga University Press.
- c. Gholib, Ibnu dan Rohman, Abdul. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- d. Khopkar. S. M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.

PRAKTIKUM 5:
PENETAPAN KADAR SECARA SPEKTROFOTOMETRI ULTRA
VIOLET

1. Kompetensi Dasar

- a. Memahami Cara penentuan panjang gelombang maksimum pada spektrum UV
- b. Memahami cara pembuatan kurva kalibrasi
- c. Memahami cara penetapan kadar sampel/sediaan farmasi.

2. Indikator Capaian

- a. Mampu menentukan panjang gelombang maksimum pada spektrum UV
- b. Mampu membuat kurva kalibrasi
- c. Mampu menetapkan kadar sampel/sediaan farmasi.

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami cara Penetapan Kadar Secara Spektrofotometri Ultra Violet

4. Uraian Teori

Analisa kuantitatif dengan metode spektrofotometri UV-Vis digolongkan atas tiga macam yaitu:

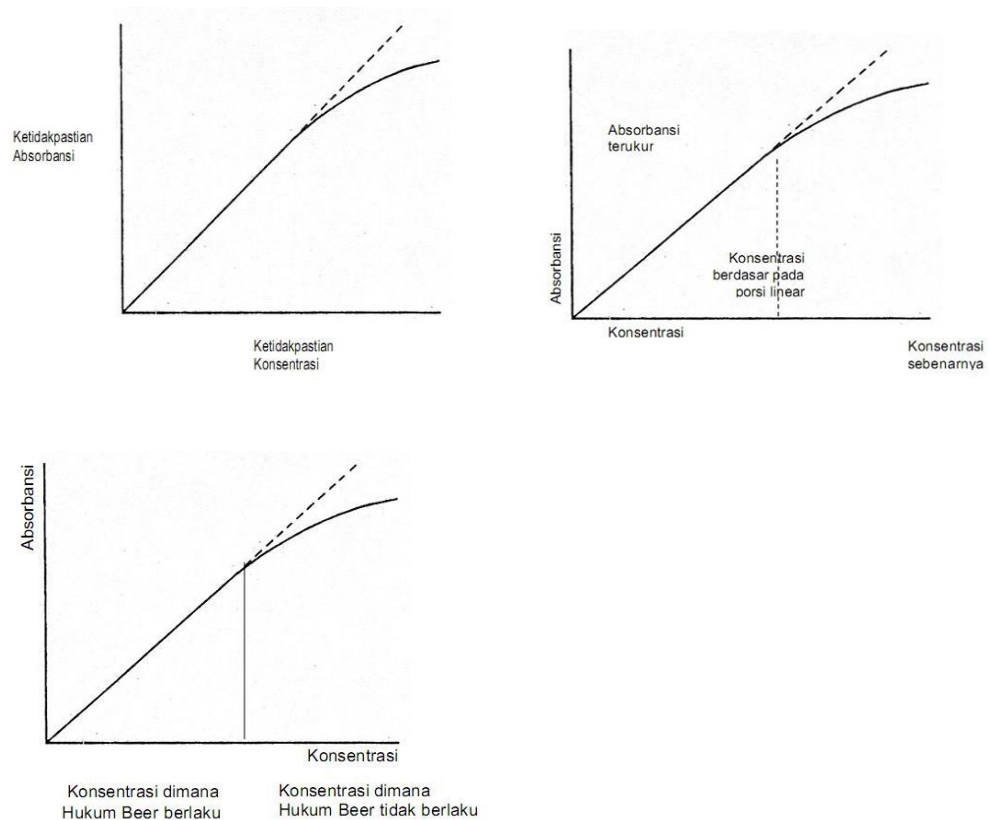
1. analisis kuantitatif zat tunggal (analisis satu komponen)
2. analisis kuantitatif dua zat (analisis dua komponen)
3. analisis kuantitatif tiga macam zat atau lebih (analisis multi komponen).

Analisa kuantitatif umumnya didasarkan atas pengukuran resapan dari larutan zat dalam pelarut yang cocok pada panjang gelombang resapan maksimum dari zat tersebut. Hubungan resapan dengan konsentrasi larutan dinyatakan dengan **Hukum Beer**: $A = a \cdot b \cdot c$. Pada analisa kuantitatif biasanya dibuat dahulu kurva standar/kurva kalibrasi. Kurva standar merupakan kurva yang dibuat dari sederetan larutan standar yang masih dalam batas linieritas sehingga dapat diregresilinierkan. Fungsi kurva standar

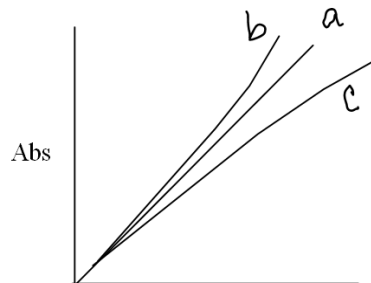
biasanya digunakan untuk menunjukkan besarnya konsentrasi larutan sampel dari hasil pengukuran sehingga konsentrasi sampel larutan bisa diperoleh dengan mudah melalui kurva standar.

Kurva standar menunjukkan hubungan antara konsentrasi larutan (sumbu-x) dengan absorbansi larutan (sumbu-y). Dari kurva standar akan dihasilkan suatu persamaan yang diregresilinerkan, yaitu persamaan $y = bx \pm a$, dengan b: *slope*/kemiringan garis, dan a: konstanta/*intersept*/perpotongan pada sumbu y. Pembuatan kurva kalibrasi/kurva standar dibuat dari larutan standar. Larutan standar merupakan suatu larutan yang telah diketahui konsentrasinya. Larutan ini berfungsi sebagai standar yang digunakan pada analisis volumetrik.

Bila kondisi percobaan memenuhi hukum Beer, maka hubungan resapan dengan konsentrasi adalah *Linier*. Penyimpangan dalam hukum ini dapat disebabkan oleh kondisi larutan atau oleh instrumen yang digunakan.



Penyimpangan ini dapat makin besar (positif) atau makin kecil (negatif) apabila konsentrasi larutan makin besar seperti terlihat pada kurva berikut:



keterangan:

- a. memenuhi hukum Beer
- b. penyimpangan positif
- c. penyimpangan negatif

Pembatasan dalam Hukum Lambert-Beer :

1. Sinar yang digunakan dianggap monokromatis
2. Peyerapan terjadi dalam volume yang memiliki penampang luas yang sama
3. Tidak ada senyawa lain yang menyerap dalam larutan senyawa
4. Tidak terjadi fluoresensi atau fosforesensi
5. Indeks bias tidak tergantung pada konsentrasi larutan

Hal-hal penting dalam pengukuran spektrofotometri UV-Visibel :

1. Terutama untuk senyawa yang semula tidak berwarna dan akan diukur dengan spektrofotometer Visibel dilakukan derivatisasi.
2. Waktu operasional (*operating time*) untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil.
3. Pemilihan panjang gelombang maksimum (λ max)
4. Pembuatan kurva baku sebaiknya sering diperiksa ulang.
5. Pembacaan absorbansi sampel/cuplikan sebaiknya dalam rentang 0,2 – 0,8.

Prosedur analisa kuantitatif meliputi:

1. Penyiapan sampel (*sample handling*)
 - a. Pelarut
 - b. Kadar sampel
2. Pemilihan panjang gelombang
3. Pengukuran resapan, dan pembuatan kurva standar (kurva Kalibrasi)
4. Perhitungan

- a. Analisa zat tunggal
- b. Analisa campuran (multikomponen)

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| - Bahan Baku/Standar | - Labu tentukur |
| - Aquadest | - Spektrofotometer UV |
| - Timbangan Analitik | - alat-alat gelas |
| - Tissue | - botol Semprot |
| - Pipet Volume | - sampel sediaan |

b. Prosedur Kerja

1). Pembuatan Spektrum

- Timbang seksama 100,0 mg baku /standar, masukkan dalam labu tentukur 100-ml, larutkan dengan aquadest sampai tanda batas (larutan Baku primer/Induk).
- pipet 2,0 ml dari larutan induk, masukkan dalam labu tentukur 100-ml, encerkan dengan aquadest. (Untuk Parasetamol dipipet 1,0 ml)
- Ukur serapan dengan Spektrofotometer

2). Pembuatan Kurva Kalibrasi

- dari larutan induk buat lima seri larutan dengan menggunakan rumus $A = a \cdot b \cdot c$
- Ukur serapan masing-masing larutan pada panjang gelombang maksimum dari spektrum baku
- Dari data tersebut hitung nilai persamaan regresi linier $Y = bx \pm a$

3). Penetapan kadar sampel

Lakukan penetapan kadar untuk sediaan Farmasi sesuai dengan cara yang tertera pada Farmakope Indonesia.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

- c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Bagaimanakah prinsip pengukuran kuantitatif suatu sample dengan metode spektrofotometri UV ?
- b. Apa saja yang perlu diperhatikan pada analisa kuantitatif dengan spektrofotometri UV
- c. Hal apa saja yang dapat mempengaruhi hasil analisa kuantitatif dengan spektrofotometri UV

8. Daftar Pustaka

- a. Anonim, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, Depkes RI, 1995, Jakarta.
- b. Mulja H.M dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumenta*. Surabaya: Airlangga University Press.
- c. Gholib, Ibnu dan Rohman, Abdul. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- d. Khopkar. S. M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.

PRAKTIKUM 6:
PENETAPAN KADAR SECARA SPEKTROFOTOMETRI VISIBEL

1. Kompetensi Dasar

- a. Memahami Cara penentuan panjang gelombang maksimum pada spektrum Visibel
- b. Memahami cara pembuatan kurva kalibrasi
- c. Memahami cara penetapan kadar sampel/sediaan farmasi.

2. Indikator Capaian

- a. Mampu menentukan panjang gelombang maksimum pada spektrum UV
- b. Mampu membuat kurva kalibrasi
- c. Mampu menetapkan kadar sampel/sediaan farmasi.

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami cara Penetapan Kadar Secara Spektrofotometri Visibel

4. Uraian Teori

Pada bab ini akan dipelajari interaksi cahaya dengan materi, instrumentasi, spektrum visible dan analisis kualitatif dan kuantitatifnya. Penetapan kadar secara spektrofotometri visible dilakukan pada daerah panjang gelombang daerah sinar tampak dilakukan pada panjang gelombang 400-800 nm. Prosedur kerja identik seperti pada daerah Ultra violet.

5. Pelaksanaan Praktikum

- a. Alat dan Bahan
 - Riboflavin
 - *Water bath*
 - Timbangan Analitik
 - Kertas saring (whatman No. 41)
 - Sampel multivitamin
 - Ultrasonik
 - Alat-alat gelas
 - Spektrofotometer UV- Vis
 - Tabung reaksi
 - Labu tentukur
 - Dapar pH 4
 - aquadest
- b. Prosedur Kerja

1) Pembuatan dapar pH 4

Campurkan 50 ml larutan Kalium Hidrogen Phtalat 0,2 M dengan 0,4 ml NaOH 0,2 M. Encerkan dengan aquadest hingga 200,0 ml ukur pH larutan hingga 4.

2) Membuat spektrum larutan standar

- Timbang seksama 10,0 mg standar riboflavin, larutkan dengan dapar hingga 10,0 ml. Ultrasonik selama 15 menit. Panaskan dalam waterbath pada suhu 60°C selama 10 menit. Pipet 1,0 ml encerkan hingga 50,0 ml dengan dapar pH 4.
- Ukur serapan dengan Spektrofotometer
- Dari spektrum diperoleh λ maksimumnm dan Absorban sebesar

3) Pembuatan Kurva Kalibrasi riboflavin

- Dari larutan induk buat lima seri larutan dengan menggunakan rumus $A = a \cdot b \cdot c$
- Larutan yang dibuat dengan konsentrasi 5 konsentrasi larutan standar
- Ukur serapan masing-masing larutan pada panjang gelombang maksimum dari spektrum baku.
- Dari data tersebut diperoleh nilai persamaan regresi linier $Y = bx \pm a$

4) Membuat larutan sampel

Timbang dan serbukkan 20 isi kapsul, timbang serbuk kapsul yang setara dengan isi 1 kapsul. Larutkan dengan dapar hingga 100,0 ml. Ultrasonik selama 15 menit. Panaskan dalam *water bath* pada suhu 60°C selama 10 menit. Pipet 1,0 ml encerkan hingga 50,0 ml dengan dapar pH 4.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Apakah syarat yang diperlukan agar suatu sample dapat dilakukan pengukuran dengan metode spektrofotometri Visible ?
- b. Apa yang dimaksud dengan teknik derivative sampel pada analisa metode spektrofotometri Visible ?

8. Daftar Pustaka

- a. Anonim, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, Depkes RI, 1995, Jakarta.
- b. Mulya, Muhammad dan Suharman. 1995. *Analisis instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.
- c. Sudjadi dan Rohman, Abdul. 2017. *Analisis Kuantitatif Obat*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press
- d. Gholib, Ibnu dan Rohman, Abdul. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- e. Wayan Redja, Drs. M. Chem, *Dasar-dasar Analisa Kuantitatif dan Analisa Instrumen Edisi I*, 1982, Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta
- f. Willerd, H.H. *et al.* 1988. *Instrumental Methods of Analysis*, Wadsworth.
- g. Khopkar. S. M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.
- h. Wayan Redja, Drs. M. Chem, *Dasar-dasar Analisa Kuantitatif dan Analisa Instrumen Edisi I*, 1982, Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta
- i. Willerd, H.H. *et al.* 1988. *Instrumental Methods of Analysis*, Wadsworth.

PRAKTIKUM 7: PENETAPAN KADAR CAMPURAN

1. Kompetensi Dasar

- a. Memahami Cara penentuan panjang gelombang maksimum pada Sampel campuran
- b. Memahami cara pembuatan kurva kalibrasi dari 2 zat aktif
- c. Memahami cara penetapan kadar Sampel campuran

2. Indikator Capaian

- a. Mampu menentukan Cara penentuan panjang gelombang maksimum pada Sampel campuran
- b. Mampu membuat kurva kalibrasi dari 2 zat aktif
- c. Mampu menetapkan kadar Sampel campuran

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami cara Penetapan Kadar Sampel campuran

4. Uraian Teori

Analisis kuantitatif campuran dua komponen merupakan teknik pengembangan analisis kuantitatif komponen tunggal. Prinsip pelaksanaannya adalah mencari absorban atau beda absorban tiap-tiap komponen yang memberikan korelasi yang linier terhadap konsentrasi, sehingga akan dapat dihitung masing-masing kadar campuran zat tersebut secara serentak atau salah satu komponen dalam campurannya dengan komponen yang lainnya

5. Pelaksanaan Praktikum

- a. Alat dan Bahan
 - Baku Parasetamol dan Cofein
 - etanol 96%
 - Labu tentukur
 - Spektrofotometer UV

- Timbangan analitik
- Pipet volume
- Sampel sediaan campuran
- alat-alat gelas
- botol Semprot

b. Prosedur Kerja

1) Pembuatan Spektrum dan kurva baku parasetamol

- Timbang seksama 10,0 mg baku murni parasetamol, masukkan dalam labu tentukur 10-ml, larutkan dengan etanol 96% sampai tanda batas (larutan Baku primer/Induk)
- Dari larutan induk buat konsentrasi parasetamol 5, 10 dan 15 ppm masukkan dalam labu tentukur 10-ml, encerkan dengan etanol 96%
- Ukur spektrum dan serapan dengan Spektrofotometer
- Dari spektrum yang diperoleh tentukan 2 buah panjang gelombang, λ_{P_1} nm dan λ_{P_2} nm

2) Pembuatan spektrum dan Kurva baku Cofein

- Timbang seksama 10,0 mg baku murni cofein, masukkan dalam labu tentukur 10-ml, larutkan dengan etanol 96% sampai tanda batas (larutan Baku primer/Induk)
- Dari larutan induk buat konsentrasi cofein 5, 10 dan 15 ppm masukkan dalam labu tentukur 10-ml, larutkan dengan etanol 96%
- Ukur spektrum dan serapan dengan Spektrofotometer
- Dari spektrum yang diperoleh tentukan 2 buah panjang gelombang, λ_{C_1} nm dan λ_{C_2} nm

3) Penetapan Kadar sampel Campuran

- Timbang teliti sampel 25,0 mg sampel, masukkan dalam labu tentukur 25-ml, larutkan dengan etanol 96% sampai tanda batas (larutan Baku primer/Induk)
- Dari larutan induk pipet 0,2 ml masukkan dalam labu tentukur 10-ml, larutkan dengan etanol 96%
- Ukur serapan dengan spektrofotometer panjang gelombang, λ_{CP_1} , λ_{CP_2} , λ_{C_1} , dan λ_{C_2} .

- Hitung kadar sampel

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

Dibuat spektrum baku parasetamol dan cofein masing-masing 3 konsentrasi

No	konsentrasi/ "c" (ppm)	Abs Parasetamol		Abs Cofein	
		λ_1	λ_2	λ_1	λ_2
1					
2					
3					

$\lambda_1 =$ nm

$\lambda_2 =$ nm

$A = a \cdot b \cdot c$	maka	$a = A/b \cdot c$
-------------------------	------	-------------------

No	konsentrasi (ppm)	"a" Parasetamol		"a" Cofein	
		λ_1	λ_2	λ_1	λ_2
1					
2					
3					
rata-rata					
<u>Notasi</u>		<u>a Pct λ_1</u>	<u>a Pct λ_2</u>	<u>a Cof λ_1</u>	<u>a Cof λ_2</u>

Data Absorban sediaan

No	Absorban Sampel Sediaan	
	λ_1	λ_2
1		
2		
3		

Persamaan untuk kadar Parasetamol

A_{Pct}	=	$a_{Pct \lambda_1} \cdot \frac{1}{c_{Pct}}$	+	$a_{Cof \lambda_1} \cdot \frac{1}{c_{Cof}}$	x $a_{Cof \lambda_2}$
A_{cof}	=	$a_{Pct \lambda_2} \cdot \frac{1}{c_{Pct}}$	+	$a_{Cof \lambda_2} \cdot \frac{1}{c_{Cof}}$	x $a_{Cof \lambda_1}$

Penetapan Kadar Pct Data 1

$$\begin{array}{rcl}
 = & \cdot 1 \cdot C_{Pct} & + \\
 = & \cdot 1 \cdot C_{Pct} & +
 \end{array}
 \begin{array}{r}
 - 1 \cdot C_{Cof} \\
 - 1 \cdot C_{Cof}
 \end{array}
 \left| \begin{array}{l} x \\ x \end{array} \right.$$

$$\begin{array}{rcl}
 = & C_{Pct} & + \\
 = & C_{Pct} & +
 \end{array}
 \begin{array}{r}
 C_{Cof} \\
 C_{Cof}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl}
 = & C_{Pct} & \\
 = & C_{Pct} &
 \end{array}$$

$$= \quad C_{Pct}$$

C Pct =	µg/ml
----------------	--------------

mg pct dalam sediaan	=	C Pct	x	Faktor pengenceran
----------------------	---	-------	---	--------------------

$$\begin{aligned} \text{mg Pct} &= \text{ug} = \text{mg} \\ \% \text{ kadar Pct} &= \frac{\text{mg}}{\text{mg}} \times 100\% \\ &= \% \end{aligned}$$

Persamaan untuk kadar Cofein

$$A_{\text{cof}} = a_{\text{Pct}} \lambda^2 \cdot 1 \cdot C_{\text{Pct}} + a_{\text{Cof}} \lambda^2 \cdot 1 \cdot C_{\text{Cof}}$$

Penetapan Kadar Cof Data 1

$$\begin{aligned} &= + \cdot 1 \cdot C_{\text{Cof}} \\ C_{\text{Cof}} &= \text{ug/ml} \end{aligned}$$

$$\text{mg cof dalam sediaan} = C_{\text{Cof}} \times \text{Faktor pengenceran}$$

$$\begin{aligned} \text{mg Cof} &= \text{ug} = \\ \% \text{ kadar Cof} &= \frac{\text{mg}}{\text{mg}} \times 100\% \\ &= \% \end{aligned}$$

Penetapan Kadar Pct Data 2

$$\begin{array}{rcl}
 = & \cdot \frac{1}{V} \cdot C_{Pct} & + \\
 = & \cdot \frac{1}{V} \cdot C_{Pct} & + \\
 \hline
 = & C_{Pct} & + \\
 = & C_{Pct} & + \\
 \hline
 = & C_{Pct} & \\
 = & C_{Pct} & \\
 \hline
 = & C_{Pct} &
 \end{array}
 \left| \begin{array}{l} x \\ x \end{array} \right.$$

$$C_{Pct} = \quad \mu\text{g/ml}$$

$$\text{mg pct dalam sediaan} = C_{Pct} \times \text{Faktor pengenceran}$$

$$\begin{array}{rcl}
 \text{mg Pct} & = & \mu\text{g} = \text{mg} \\
 \% \text{ kadar Pct} & = & \frac{\text{mg}}{\text{mg}} \times 100\% \\
 & = & \%
 \end{array}$$

Persamaan untuk kadar Cofein

$$A_{cof} = a_{Pct} \lambda^2 \cdot \frac{1}{V} \cdot C_{Pct} + a_{Cof} \lambda^2 \cdot \frac{1}{V} \cdot C_{Cof}$$

Penetapan Kadar Cof Data 2

$$\begin{aligned} &= & + & .1. \text{ C Cof} \\ \text{C Cof} &= & \text{ug/ml} \end{aligned}$$

$\text{mg cof dalam sediaan} = \text{C Cof} \times \text{Faktor pengenceran}$

$$\begin{aligned} \text{mg Cof} &= & \text{ug} &= \\ \% \text{ kadar Cof} &= & \frac{\text{mg}}{\text{mg}} \times 100\% \\ &= & \% \end{aligned}$$

Penetapan Kadar Pct Data 3

$$\begin{array}{r}
 = \quad \cdot \frac{1}{V} \cdot C_{Pct} \quad + \quad \cdot \frac{1}{V} \cdot C_{Cof} \quad | \quad x \\
 = \quad \cdot \frac{1}{V} \cdot C_{Pct} \quad + \quad \cdot \frac{1}{V} \cdot C_{Cof} \quad | \quad x \\
 \hline
 = \quad C_{Pct} \quad + \quad C_{Cof} \\
 = \quad C_{Pct} \quad + \quad C_{Cof} \\
 \hline
 = \quad C_{Pct} \\
 = \quad C_{Pct} \\
 \hline
 \end{array}$$

$$= C_{Pct}$$

$$C_{Pct} = \quad \mu\text{g/ml}$$

$$\begin{array}{|l}
 \text{mg pct dalam sediaan} \\
 \hline
 \end{array}
 = C_{Pct} \times \text{Faktor pengenceran}$$

$$\text{mg Pct} = \text{ug} = \text{mg}$$

$$\% \text{ kadar Pct} = \frac{\text{mg}}{\text{mg}} \times 100\%$$

$$= \%$$

Persamaan untuk kadar Cofein

$$A_{\text{cof}} = a_{\text{Pct}} \lambda_2 \cdot 1 \cdot C_{\text{Pct}} + a_{\text{Cof}} \lambda_2 \cdot 1 \cdot C_{\text{Cof}}$$

Penetapan Kadar Cof Data 3

$$C_{\text{Cof}} = \text{ug/ml} + \cdot 1 \cdot C_{\text{Cof}}$$

$$\text{mg cof dalam sediaan} = C_{\text{Cof}} \times \text{Faktor pengenceran}$$

$$\text{mg Cof} = \text{ug} =$$

$$\% \text{ kadar Cof} = \frac{\text{mg}}{\text{mg}} \times 100\%$$

$$= \%$$

Data % Kadar sediaan

No	% kadar <u>PCT</u>	% kadar <u>Coffein</u>
1		
2		
3		
Rata-Rata		
SD		
SDR		

7. Soal Latihan

Bagaimana prinsip analisa kuantitatif senyawa campuran dengan metode Spektrofotometri UV

8. Daftar Pustaka

- a. Anonim, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, Depkes RI, 1995, Jakarta.
- b. Mulya, Muhammad dan Suharman. 1995. *Analisis instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.
- c. Gholib, Ibnu dan Rohman, Abdul. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- d. Wayan Redja, Drs. M. Chem, *Dasar-dasar Analisa Kuantitatif dan Analisa Instrumen Edisi I*, 1982, Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta
- e. Willerd, H.H. *et al.* 1988. *Instrumental Methods of Analysis*, Wadsworth.
- f. Khopkar. S. M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.

PRAKTIKUM 8: SPEKTROSKOPI SERAPAN ATOM

1. Kompetensi Dasar

- a. Memahami jenis-jenis preparasi sampel organik dan anorganik
- b. Memahami cara preparasi sampel organik dan anorganik

2. Indikator Capaian

- a. Mampu memahami tipe-tipe Spektrofotometri Atomik, prinsip kerja dan cara Analisisnya
- b. Memahami jenis-jenis preparasi sampel organik dan anorganik

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami cara preparasi sampel untuk analisa dengan Spektrofotometri Atomik

4. Uraian Teori

Spektroskopi serapan atom dipergunakan untuk mengidentifikasi dan menentukan keberadaan ion logam baik secara kualitatif maupun kuantitatif dalam semua jenis materi dan larutan. Pengukuran dalam spektroskopi serapan atom berdasarkan radiasi yang diserap oleh atom yang tidak tereksitasi dalam bentuk uap. Metode Spektroskopi serapan atom berprinsip pada absorbs cahaya oleh atom-atom menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu, dan hal ini tergantung pada sifat unsurnya. Transisi elektronik suatu unsure bersifat spesifik. Dengan absorbs energy, berarti memperoleh energy yang lebih banyak, suatu atom dinaikkan tingkat energinya dari keadaan dasar ke tingkat eksitasi.

Teknik serapan biasanya disertai pemasukan suatu larutan sample dalam bentuk aerosol dalam nyala. Evaporasi pelarut dan penguapan garam terjadi terlebih dahulu untuk mendisosiasi garam ke dalam atom-atom gas yang bebas. Pada suhu udara asetilen (kurang lebih 2300°C) atom dari sejumlah banyak unsur berada dalam keadaan dasar. Jika seberkas energi radiasi yang terdiri dari spectrum emisi untuk unsur tertentu yang akan ditentukan dilewatkan melalui nyala ini, sejumlah atom dalam keadaan dasar akan

menyerap energi dari panjang gelombang yang karakteristik (garis resonansi) dan mencapai keadaan energi yang lebih tinggi.

Sejumlah energi radiasi yang diserap sebagai fungsi konsentrasi unsur dalam nyala merupakan dasar spektroskopi serapan atom. Untuk beberapa unsur seperti logam alkali Na dan K, nyala udara asetilen cukup panas tidak hanya menghasilkan atom-atom dalam keadaan dasar tetapi juga menaikkan jumlah atom ke keadaan elektronik tereksitasi. Energi radiasi dipancarkan (diemisikan) jika atom-atom kembali ke keadaan dasar yang sebanding dengan konsentrasi dan merupakan dasar spektroskopi emisi nyala.

Spektroskopi atom digunakan untuk mengidentifikasi dan menentukan (kualitatif dan kuantitatif) logam-logam dalam tingkat “*trace*” dalam semua jenis materi dan larutan. Pengukuran dalam spektroskopi serapan atom (SSA) berdasarkan radiasi yang diserap oleh atom yang tidak tereksitasi dalam bentuk uap. Dalam spektroskopi emisi, pengukuran berdasarkan energi yang diemisikan ketika atom-atom dalam keadaan tereksitasi untuk kembali ke keadaan dasar. Spektroskopi emisi nyala (SEN) adalah suatu spektroskopi emisi dari daerah khusus yang mana atom dieksitasi dengan menggunakan nyala.

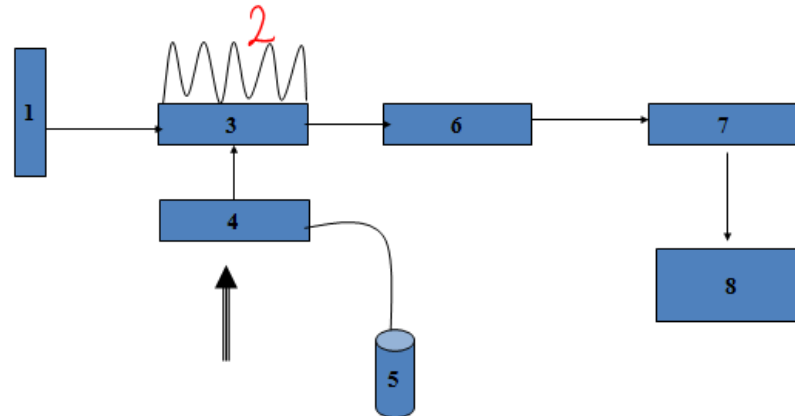
Pada dasarnya AAS mempunyai prinsip kerja yang hampir sama dengan Spektrofotometri UV-Vis. AAS adalah metode analisis untuk menentukan unsur-unsur logam secara kualitatif dan kuantitatif dalam jumlah sangat kecil (*trace element* [dalam ppm]) berdasarkan Serapan atau absorpsi radiasi oleh atom bebasnya. Interaksi yang terjadi pada AAS antara lain: Absorpsi (penyerapan), Refleksi (pemantulan) dan Refraksi (Bias)

Keuntungan/Kelebihan AAS:

1. Dapat menentukan kadar logam dari suatu campuran yang sangat kompleks dengan cepat dan ketepatan yang tinggi
2. Dapat menentukan kadar logam yang konsentrasinya sangat kecil tanpa harus dipisahkan terlebih dahulu
3. Dapat mengukur kandungan logam dengan satuan *part permillion/ppm*

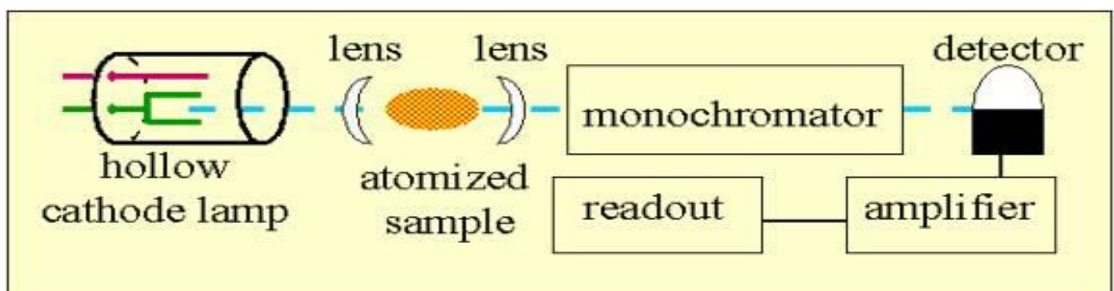
Kelemahan AAS:

1. Kurang sensitif untuk penentuan sampel bukan logam
2. Kemampuan terbatas pada penentuan tingkat oksidasi dan lingkungan kimiawi sampel yang dianalisis



INSTRUMENTASI

1. Sumber Cahaya
2. *Flame*/Nyala Api yang berasal dari “*Burner*”
3. *Burner*/Alat pembakar
4. *Nebulizer*
5. Larutan Sampel
6. Monokromator
7. Detektor
8. Rekorder



Suatu sampel pertama-tama harus dilarutkan, proses pelarutan dikenal dengan istilah destruksi yang bertujuan untuk membuat unsur logam menjadi ion logam yang bebas. Terdapat 2 cara destruksi yaitu:

1. Destruksi basah : sampel ditambahkan asam-asam oksidator, jika perlu dilakukan dengan pemanasan.
2. Destruksi kering : sampel langsung dipanaskan untuk diabukan.

Hasil destruksi baik secara basah maupun kering kemudian dilarutkan. Larutan sample dimasukkan ke dalam nyala dalam bentuk aerosol yang selanjutnya akan membentuk atom-atomnya. Serapan akan terjadi dari radiasi suatu sinar yang sesuai dengan atom yang ditentukan.

B. PERCOBAAN

Prinsip operasi metode ini yaitu diperlukan sumber cahaya dari luar yang memancarkan sinar dengan panjang gelombang tertentu, yang sesuai dengan energi yang diperlukan untuk mengubah tingkat energi elektronik dari tingkat dasar ke tingkat eksitasi suatu unsur. Sinar dengan panjang gelombang yang diperlukan ini dilewatkan nyala mengandung unsur yang akan diukur.

Perbedaan antara intensitas sinar mula-mula dengan intensitas sinar yang diteruskan diukur dan perbedaan ini sebagai nilai absorban dan besarnya berbanding lurus dengan konsentrasi unsur yang mengabsorpsi sinar tersebut.

Beberapa percobaan berikut ini meliputi usaha untuk dapat memahami hal-hal sebagai berikut :

1. Pembuatan kurva kalibrasi
2. dan menentukan batas deteksi
3. Mempelajari beberapa sifat gangguan dan cara mengatasinya
4. Mencari kondisi umum seperti :
 - kecepatan gas pembakar
 - kecepatan gas oksidan
 - tinggi *burner head*
5. Menentukan kadar suatu unsur

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

b. Prosedur Kerja

1). Untuk konstituen mineral :

Pisahkan dengan hati-hati semua materi asing, khususnya tanah dan pasir yang melekat, tetapi cegah adanya “*leaching*”, hindari pencucian yang terus menerus. Gunakan udara atau oven pengering secepat mungkin untuk mencegah dekomposisi atau hilangnya berat oleh respirasi, haluskan dan simpan dalam botol tertutup. Jika hasil diharapkan yang berasal dari berat segar, catat berat sampel sebelum dan sesudah pengeringan.

2). Teknik Pengabuan (*dry ashing*) :

a) Proses pengabuan

- Ditimbang sebanyak 5,0 g sampel, masukkan ke dalam krusibel porselin
- Haluskan dan keringkan, pada suhu 105-110° selama 45 menit (arangkan sampel terlebih dahulu di atas *hot plate*)
- Diabukan dalam tanur/*furnace* selama lebih kurang 1,5 jam pada suhu 500°C.

b) Penentuan kadar logam dengan SSA

- sampel yang telah menjadi abu ditambahkan HCl 10 M sebanyak 10 ml
- kemudian panaskan di atas *hot plate* sampai abunya terlarut
- abu yang terlarut dipindahkan dalam labu tentukur 100-ml, dan disaring encerkan dengan HNO₃ 0,1 M sampai garis batas
- Ukur konsentrasi logam dengan SSA pada panjang gelombang masing-masing logam, bila melebihi rentang serapan standar lakukan pengenceran. Lakukan triplo

3). Teknik Destruksi Basah (*wet ashing*)

- Ditimbang sebanyak 5 g sampel, masukkan ke dalam labu bulat/labu kjehdal
- Kemudian ditambahkan $\text{HNO}_{3(p)}$: $\text{HCl}_{(p)}$ 1:3 sebanyak 12 ml
- kemudian panaskan di atas *hot plate* selama 30 menit sampai hilang gasnya dan sampel larut.
- Dinginkan lalu disaring. Filtrat diencerkan dengan aquabidest dalam labu tentukur 50-ml (pH sekitar 2-4).
- Ukur konsentrasi logam dengan SSA pada panjang gelombang masing-masing logam. Lakukan triplo

4). Pembuatan kurva standar

Siapkan larutan standar sesuai dengan jenis unsur yang akan ditentukan (untuk kurva kalibrasi)

- Untuk unsur : Fe, Cu, Mn, dan Zn konsentrasi dari 0–5,0 ppm
- Untuk unsur : Ca, Mg, dan K konsentrasi dari 0–10 ppm.
- Untuk unsur : Pb konsentrasi dari 0–20,0 ppm.
- Untuk unsur : Cd konsentrasi dari 0–2,0 ppm.
- Lihat panduan pada “*Manual Book*” alat sesuai dengan instrumen yang dimiliki

5) Prosedur pengukuran

- Persiapkan pengoperasian alat
- Ukur serapan larutan standar
- Ukur serapan larutan sampel dalam kondisi yang sama dengan larutan standar.
- Buatlah kurva kalibrasi dengan metode “*least square*” hitung koefisien korelasi.
- Tentukan batas deteksi alat terhadap unsur melalui larutan standar.
- Hitung kadar unsur dalam sampel

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Bagaimanakah prinsip pengukuran kuantitatif suatu sample dengan metode spektrofotometri Serapan Atom ?
- b. Apakah syarat yang diperlukan agar suatu sample dapat dilakukan pengukuran dengan metode spektrofotometri Serapan Atom ?
- c. Gambarkan prinsip peralatan Spektrometer Serapan Atom?
- d. Apakah semua jenis sample (padat, cair dan gas) dapat dilakukan pengukuran secara langsung dengan Spektrometer Serapan Atom? Jelaskan!
- e. elaskan apakah yang dimaksud dengan destruksi kering dan destruksi basah?

8. Daftar Pustaka

- a. Gholib, Ibnu dan Rohman, Abdul. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- b. Khopkar. S. M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.

PRAKTIKUM 9: SPEKTROSKOPI INFRA MERAH

1. Kompetensi Dasar

- a. Memahami Spektrofotometri Infra merah
- b. Memahami prinsip kerja Spektrofotometri Infra merah
- c. Memahami cara Analisis dengan Spektrofotometri Infra merah

2. Indikator Capaian

- a. Mampu memahami prinsip kerja Spektrofotometri Infra merah
- b. Memahami cara Analisis dan preparasi sampel dengan Spektrofotometri Infra merah

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami analisa senyawa secara Spektrofotometri Infra merah

4. Uraian Teori

Spektrofotometer infra merah sangat penting dalam analisa kimia modern (meskipun bukan satu-satunya) dalam bidang organik. Alat ini biasanya digunakan untuk mendeteksi gugus fungsional, mengidentifikasi senyawa dan menganalisis campuran. Prinsip dari analisa didasarkan pada besarnya frekuensi sinar infra-merah yang diserap dengan tingkat energi tertentu. Apabila frekwensi tertentu diserap ketika melewati sampel yang dianalisa, maka energi dari frekuensi tersebut akan ditransfer ke senyawa tersebut. Energi pada radiasi infra-merah sebanding dengan energi yang timbul pada getaran-getaran ikatan (energi vibrasi, translasi dan rotasi molekul).

Karena setiap tipe ikatan yang berbeda mempunyai sifat frekuensi vibrasi yang berbeda, dan karena tipe ikatan yang sama dalam dua senyawa berbeda terletak dalam lingkungan yang sedikit berbeda, maka tidak ada dua

molekul yang berbeda strukturnya akan mempunyai bentuk serapan inframerah (IR) atau spectrum inframerah (IR) yang tepat sama. Dengan membandingkan spektrum IR dari dua senyawa yang diperkirakan identik, maka seseorang dapat menyatakan apakah kedua senyawa tersebut identik atau tidak. Pelacakan tersebut lazim dikenal dengan bentuk “sidik jari” dari dua spectrum inframerah (IR). Jika puncak spectrum IR dari kedua senyawa tepat sama maka dalam banyak hal dua senyawa tersebut adalah identik.

Penyerapan daerah infra merah (IR= *Infra red*) terbatas pada transisi dengan perbedaan energi yang kecil yang terdapat diantara tingkatan vibrasi dan rotasi, yaitu pada daerah dengan bilangan gelombang $13000 - 33 \text{ cm}^{-1}$. yang biasa digunakan adalah antara $4000 - 667 \text{ cm}^{-1}$.

Bila suatu molekul menyerap sinar IR maka di dalam molekul akan terjadi perubahan tingkat energi vibrasi/rotasi tetapi hanya transisi vibrasi/rotasi yang dapat menyebabkan perubahan momen dipol yang aktif mengabsorpsi sinar IR. Di samping itu frekuensi sinar yang datang harus sama dengan salah satu frekuensi vibrasi/rotasi molekul. Spektro yang dihasilkan umumnya rumit, mempunyai pita-pita serapan yang sangat sempit dan khas untuk tiap senyawa sehingga penggunaannya terutama untuk identifikasi senyawa organik (kualitatif), sedangkan untuk tujuan kuantitatif analisis ini tidak banyak dipakai.

Spektrum IR merupakan kurva aluran %T sebagai ordinat dan bilangan gelombang sebagai absis. Kedudukan relatif atom-atom di dalam molekul tidak tetap melainkan berubah-ubah secara terus menerus, sebagai akibat vibrasi bermacam-macam. Untuk molekul sederhana jumlah dan jenis vibrasi dapat dengan mudah ditentukan jenis vibrasi yang dikenal :

1. vibrasi rentangan : perubahan jarak dari 2 atom
2. vibrasi lipatan : perubahan sudut antara 2 atom
3. *wagging* : mengibas dengan arah yang sama
4. *Rocking* : menyusun dengan arah yang sama

5. *Twisting* : mengibas berlawanan arah

6. *Scissoring* : gerakan menggunting

untuk molekul beratom banyak pusat vibrasi menjadi banyak, selain kemungkinan terjadinya interaksi antara vibrasi atau *coupling*.

Tabel Beberapa Frekuensi Infra Merah Gugus Fungsi

Gugus Fungsi	Panjang gelombang (μm)	Frekuensi (cm^{-1})
O-H Alkohol/fenol bebas	2.74-2.79	3580-3650
Asam	3.70-4.00	2500-2700
NH Amina primer, sekunder dan amida	6.10-6.45	3140-3320
CH Alkana	3.37-35.0	2850-2960
Alkena	3.23-3.32	3010-3095
Alkuna	3.03	3300
Aromatik	~3.30	~3030
-CH ₂ - Bengkokan	6.83	1465
-CH ₃ Bengkokan	6.90-7.27	1450-1375
CC Alkana	4.42-4.76	2190-2260
Alkena	5.95-6.16	1620-1680
Aromatik	~6.25	1475-1600
C=O Aldehid	5.75-5.81	1720-1740
Keton	5.79-5.97	1675-1725
Asam	5.79-5.87	1700-1725
Ester	5.71-5.86; 5.52-5.68	1720-1750
Anhidrida		1760-1810
CN Nitrit	4.35-5.00	2000-3000
NO ₂ Nitro	6.06-6.67	1500-1650

Kebanyakan gugus seperti C-H, O-H, C=O, dan C=N, mempunyai serapan IR yang hanya bergeser sedikit dari satu molekul ke molekul lain. Berikut ini tabulasi beberapa gugus fungsi yang khas memiliki serapan tertentu pada daerah inframerah (IR).

A. INSTRUMENTASI

Alat spektrofotometer IR terdiri dari komponen-komponen pokok, yaitu: sumber sinar, tempat sampel, monokromator, detector, dan recorder.

1. **Sumber sinar** : yang biasa digunakan adalah zat padat inert yang dipanaskan dengan listrik pada temperatur antara 1500 – 2000⁰K, dengan intensitas yang dihasilkan pada 5000–6000 cm⁻¹. Tiga (3) jenis sumber yang biasa digunakan adalah: Nernst glower, glowbar dari silicon karbida dan kawat nikrom.
 - a. Nikhrom, merupakan gulungan Kawat Nikhrom namun intensitas sumber ini agak terbatas.
 - b. *Nernst Glower*, merupakan hasil pijaran Zirkonium Oksida yang dijepit kedua ujungnya dengan keramik
 - c. *globar*, merupakan suatu senyawa Silikon Karbida.

2. **Sampel kompartemen**, sampel yang dianalisis dapat berupa cairan, padatan atau gas. Sampel cairan atau padatan harus dipreparasi terlebih dahulu dalam bentuk film tipis. Sedangkan bentuk gas diperlukan tabung khusus.

3. **Monokromator** : terdiri dari sistem celah masuk, celah keluar, alat-alat pendispersi dan beberapa cermin untuk memantulkan kembali atau memfokuskan.

Monokromator ada 2 macam, yaitu:

 - a. Monokromator celah, berfungsi untuk memurnikan radiasi IR agar masuk dalam rentang bilangan yang dikehendaki.
 - b. Monokromator prisma, terbuat dari garam anorganik berfungsi sebagai pengurai dan pengarah radiasi IR menuju detektor

Pendispersi yang digunakan :

 - 1). Kisi difraksi
 - 2). Prisma yang dibuat dari hablur NaCl, KBr, CsBr, dan LiF

Monokromator yang dipakai saat ini adalah kisi difraksi (*grating*), keunggulan monokromator ini memberikan resolusi yang jauh lebih baik.

- c. **Detektor** : yang biasa digunakan adalah detector fotokonduktif dari semi konduktor (PbS, PbSe, atau Ge) atau detektor termal seperti termokopel, holometer, dan sel Golay.
- d. **Amplifier**, berfungsi untuk memperkuat sinyal dari radisi IR.
- e. **Rekorder**, mencatat hasil spektrum IR

Jenis Spektrofotometer IR

1. Spektrofotometer IR Dispersif
2. Spektrofotometer Fowrier Transform – IR (FT-IR)

Spektrofotometer IR yang diperdagangkan biasanya menggunakan sistem berkas ganda (*double beam*) dengan energi radiasi secara bergantian melalui sampel dan zat pembanding.

C. AGILENT CARY 630 FTIR SPECTROMETER

Spektrometer FTIR Agilent cary 630 adalah alat yang bentuk fisiknya kecil dibandingkan dengan FTIR sebelumnya. Alat ini di design untuk menganalisa gugus fungsi yang ada pada sampel yang digunakan. Sistem optic berdimensi 16 x 22 x 13 cm, dengan berat 2,9 Kg.

Alat ini dilengkapi dengan aksesoris yang dapat mengakomodir analisa sampel dengan bentuk cair, serbuk, gas, pasta dan gel. Adapun aksesoris yang melengkapi adalah:

- a Diamond ATR : untuk analisa cairan, serbuk, pasta dan gel.
- b Transmission : infra merah kalsik yang menggunakan interface pada pembacaan sampel, yang digunakan untuk analisa sampel padatan, cairan dan gas. Dengan sel untuk gas setebal 50 mm
- c TumbIR : digunakan untuk analisa bahan kimia bentuk larutan dengan kondisi lingkungan di bawah standar, dengan satu garis gelombang
- d DialPath : digunakan untuk analisa bahan kimia bentuk larutan dengan kondisi lingkungan di bawah standar, dengan 3 garis gelombang kecil. Yang

memungkinkan kita memilih garis gelombang yang lebih sensitive untuk analisa.

- e Diffuse Reflectance : untuk analisa kualitatif dan kuantitatif sampel serbuk dan padatan



Gambar Spektrometer FTIR Agilent cary 630

Prosedur dasar analisa untuk semua aksesoris adalah sebagai berikut:

- a. Bersihkan tempat sampel
- b. Scanning background sampel
- c. Scanning spectrum sampel.

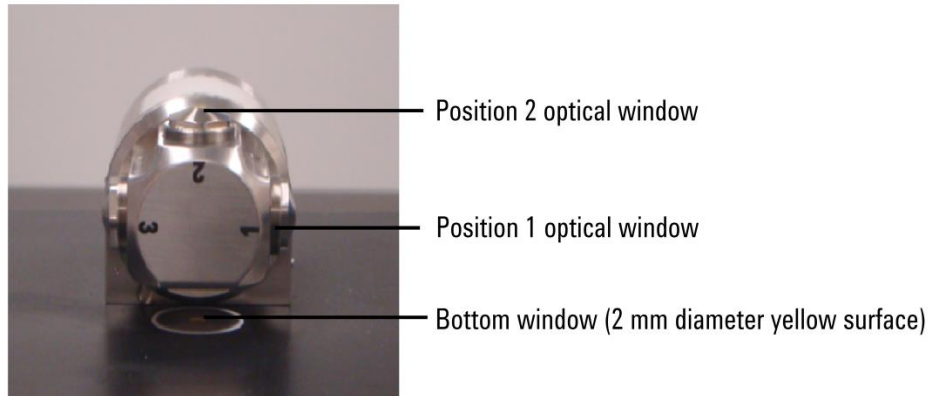
1. DIAMOND ATR SAMPLE ACCESSORY

The Diamond attenuated total reflectance (ATR) adalah aksesoris sampling dengan keuntungan menggunakan perbedaan refraksi cahaya melalui 2 material. Aksesoris ini dapat digunakan untuk untuk analisa sampel bentuk cairan, serbuk, pasta dan gel.

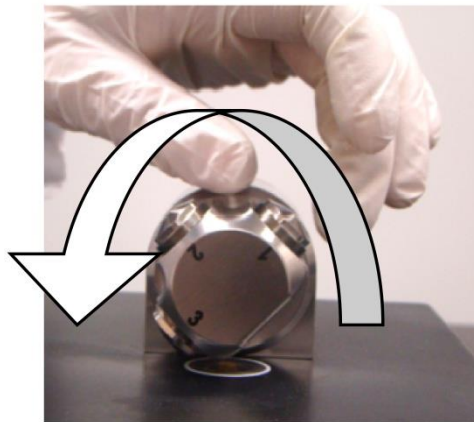
Diamond ATR accessory menggunakan Kristal dari berlian atau intan dari golongan IIa sebagai interface antara sampel dan energy infra merah. Kelebihan dari Kristal ini merupakan Kristal yang sangat keras dan deang daya tahan terhadap bahan kimia yang besar. Dan dapat bekerja pada

rentang pH range dari 1 hingga 14. Bahkan aman untuk analisa sampel menggunakan asam pekat.

2. DIALPATH



Gambar DialPath



Gambar cara memutar tempat sampel dialPath

C. Tabel Parameter Analisa FTIR

Parameter	Value
Instrument	Agilent Cary 630
Source	Ceramic
Sampling	1000 μm DialPath™
Optics	ZnSe
Detector	DTGS
Scans	128
Resolution	4 cm^{-1}

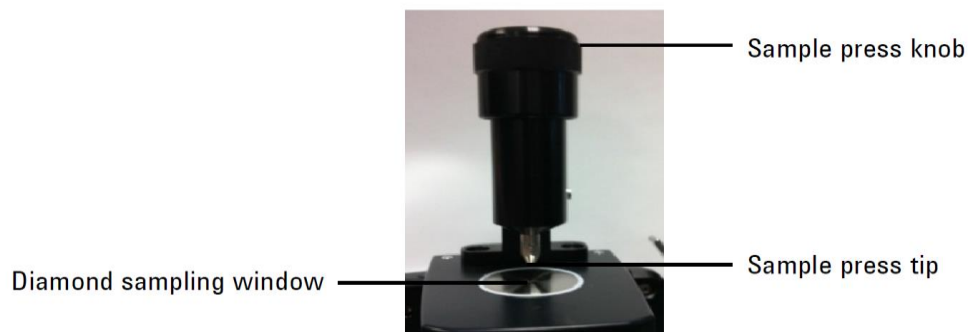
5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

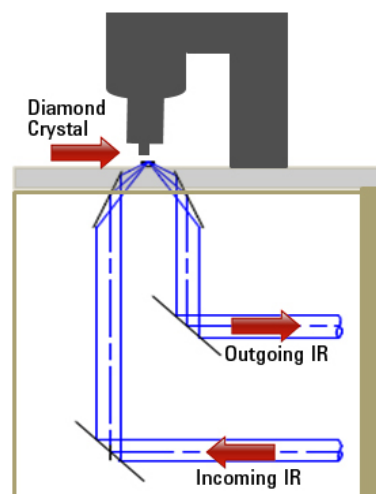
- Spektrometer FTIR Agilent Cary 630
- Bahan baku Farmasi
- Bahan Kimia (padat dan Cair)
- etanol
- cotton bud
- tissue lensa

b. Prosedur Kerja

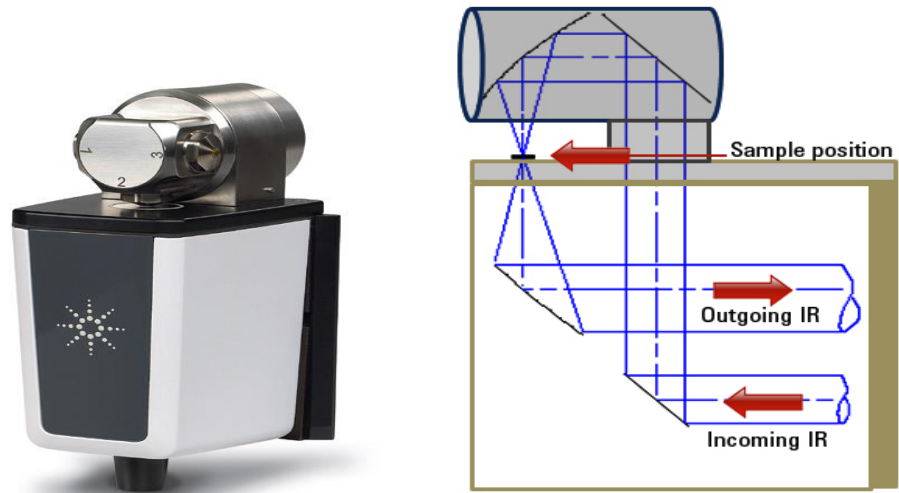
1). CARA ANALISA



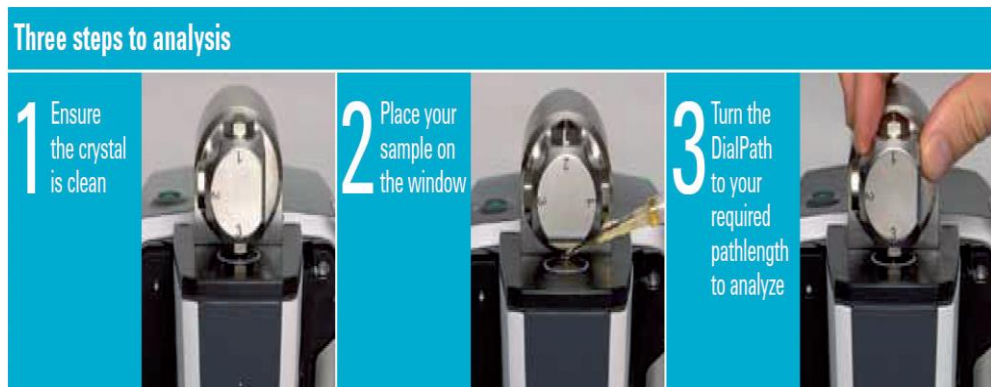
Gambar Diamond ATR dengan tekanan sampel



Gambar. Diamond ATR optical diagram

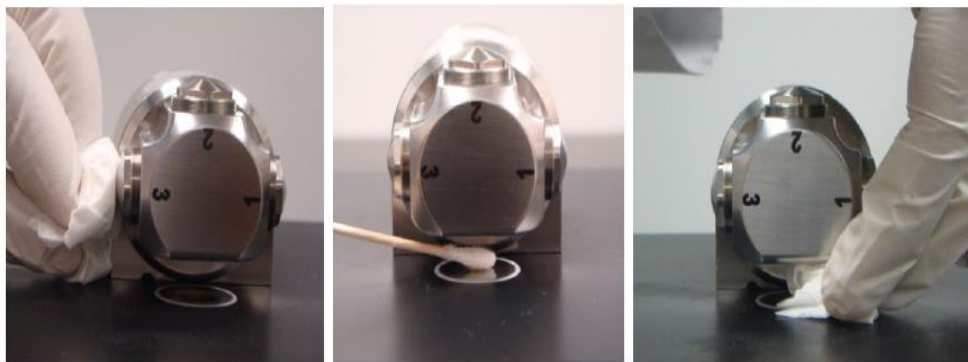


Gambar. Dial path



Gambar. Analisis dengan Dial path

3. PROSEDUR PEMBERSIHAN DIALPATH



Gambar Cara membersihkan area sampel DialPath

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Mengapa sebelum melakukan pengukuran kualitatif dengan spektrometer Infra Red, spektrometer harus dikalibrasi menggunakan film polistyrene ? Bagaimanakah prinsip pengukuran kualitatif suatu sample dengan metode spektrofotometri Infra Red ?
- b. Jelaskan mengapa spektrometer Infra Red lebih banyak digunakan untuk mengukur kualitatif dibandingkan untuk pengukuran kuantitatif ?
- c. Gambarkan prinsip peralatan Spektrometer Infra Red ?
- d. Informasi apa sajakah yang dapat dihasilkan dari pengukuran sample dengan Spektrometer Infra Red?
- e. Apakah semua jenis sample (padat, cair dan gas) dapat dilakukan pengukuran secara langsung dengan Spektrometer Infra Red ? Jelaskan!
- f. Jelaskan apakah yang dimaksud dengan Spektrometer Fourier Transform Infra Red?
- g. Jelaskan apakah syarat pelarut yang dapat digunakan pada pengukuran dengan Spektrometer Infra Red ?
- h. Jenis detektor apa yang biasa digunakan dalam Spektrometer Infra Red ?
- i. Jelaskan apakah guna KBr pada pengukuran dengan Spektrometer Infra Red dengan cara pelet KBr ?
- j. Mengapa pelarut polar tidak dapat digunakan pada pengukuran sample dengan Spektrometer Infra Red ?

8. Daftar Pustaka

- a. Mulja H.M dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumenta*. Surabaya: Airlangga University Press.
- b. Gholib, Ibnu dan Rohman, Abdul. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- c. Khopkar. S. M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.
- d. Creswell, J, Runquist, A, Campbell, M. 2005. *Analisis Spektrum Senyawa Organik*. Bandung : ITB

PRAKTIKUM 10:
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

1. Kompetensi Dasar

- a. Memahami jenis-jenis Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
- b. Memahami prinsip kerja Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
- c. Memahami jenis-jenis kolom dan detektor pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
- d. Memahami cara Analisis dengan Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

2. Indikator Capaian

- a. Mampu menjelaskan prinsip kerja Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, jenis-jenis kolom dan detektor pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
- b. Mampu melakukan Analisis dengan Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

3. Tujuan Praktikum

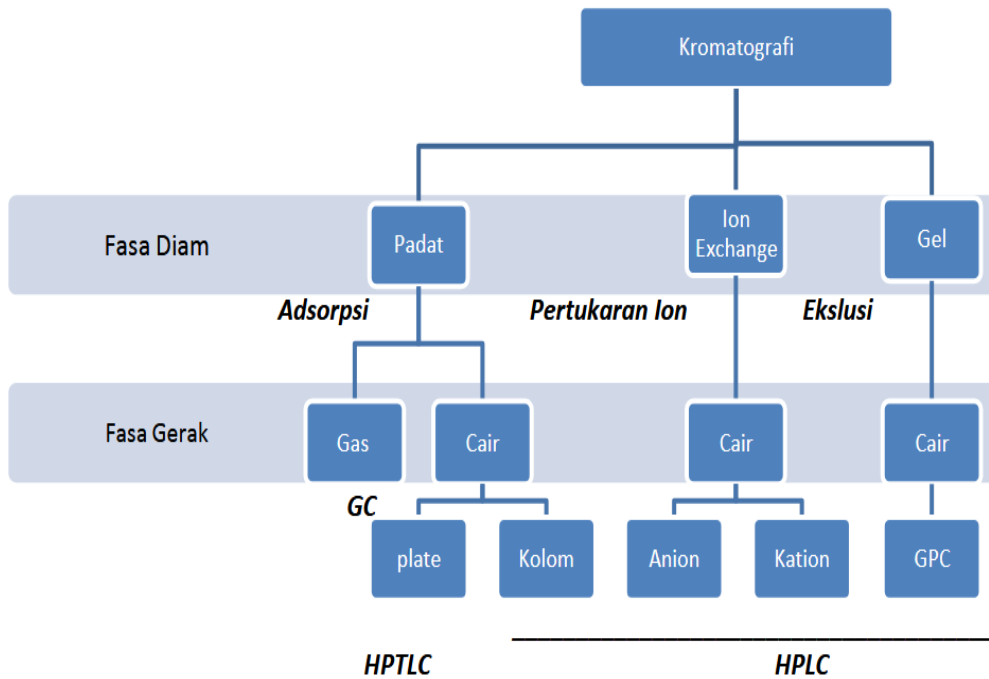
Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami Cara kerja Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

4. Uraian Teori

a. Kromatografi

Secara Terminologis Kromatografi adalah krom yang berarti warna dan grafi yang berarti pita-pita. Kromatografi adalah Adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia yang berdasar pada perbedaan migrasi dari masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam(padat atau cair) di bawah pengaruh pergerakan fase gerak(cair atau gas). Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal istilah kromatografi penyerapan (adsorption chromatography). Bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi pembagian (*partition chromatography*).

Berdasarkan fase gerak yang digunakan, kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu gas chromatography dan liquid chromatography. Masing-masing golongan dapat dibagi lagi seperti yang telah disebutkan pada definisi di atas.



Asas dan Dasar-dasar Kromatografi, antara lain:

1. Kromatografi dengan asas adsorpsi, memakai fase diam padat dan fase gerak cair atau gas
2. Kromatografi dengan asas partisi, memakai fase diam cair dan fase gerak cair
3. Kromatografi dengan asas filtrasi, memakai fase diam padat yang mempunyai sifat filtrasi dan fase gerak cairan
4. Kromatografi dengan asas suhu kritis, memakai CO₂ dalam keadaan superkritis

Kromatografi dapat dibedakan menjadi 2 kelompok yaitu:

1. Menurut proses pemisahannya dibedakan menjadi: Kromatografi adsorpsi, Kromatografi partisi, Kromatografi pasangan ion, Kromatografi penukar ion, Kromatografi eksklusif, Kromatografi afinitas
2. Menurut alat yang digunakan terdiri dari 3 alat yang selalu dapat dikembangkan perlengkapannya ialah:
 - a. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat juga dikenal dengan *thin layer chromatography* (TLC). Dan **kromatografi Kertas**
 - b. Kromatografi Gas, jenis kromatografi kolom yang menggunakan fase gerak gas.(GC)
 - c. **Kromatografi cair kinerja tinggi** atau KCKT, dan berasal dari terjemahan *High Performance Liquid Chromatography* atau **HPLC**. Kromatografi ini termasuk kromatografi kolom yang fase geraknya berupa cairan dan dialirkan berdasar kekuatan dari tekanan yang diberikan.

Berdasarkan fase gerak yang digunakan, kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu *gas chromatography* dan *liquid chromatography*. Tujuan analisa dengan kromatografi adalah pemisahan komponen zat dalam campuran (pemurnian), identifikasi, analisa kualitatif, analisa kuantitatif dan untuk preparatif.

Kromatografi Cair Kinerja tinggi atau disingkat KCKT adalah istilah yang populer di Indonesia. Beberapa pihak hanya memberi istilah *LC (Liquid Chromatography)*. Di dunia Internasional digunakan istilah *HPLC* yang mempunyai dualisme pengertian, yaitu:

- a. *High Performance Liquid Chromatography*
- b. *High Pressure Liquid Chromatography*

Kromatografi merupakan salah satu metode analisis yang perkembangannya dapat dikatakan sangat pesat. Didalam kromatografi tercakup sekaligus metode pemisahan dan metode penentuan baik secara kualitatif dan kuantitatif. Kromatografi secara umum adalah suatu metode pemisahan cuplikan diantara dua fase diam dan fase gerak. Fase diam dapat

berupa zat padat atau cair, sedangkan fase geraknya dapat berupa gas atau zat cair. Bila fase gerak yang digunakan adalah zat cair maka metode ini dinamakan dengan kromatografi cair. Bila fase gerak yang digunakan berupa cairan yang digerakkan dengan cepat dengan bantuan tekanan dan hasilnya dideteksi dengan instrumen, proses ini disebut dengan **Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**.

Fungsi fase gerak membawa analit untuk masuk dan keluar dari kolom. Pertimbangan pada pemilihan fase gerak, antara lain: sifat dan polaritas analit/sampel, serta polaritas pelarut. KCKT bila ditinjau dari system peralatannya termasuk kromatografi kolom karena dipakai fase diam yang diisikan di dalam kolom. Namun bila ditinjau dari proses pemisahannya dapat digolongkan kromatografi absorpsi (partisi) tergantung pada butiran-butiran yang sebagai ada dalam kolom.

Keuntungan KCKT antara lain: waktu analisa singkat, daya pisah baik, peka, kolom dapat dipakai kembali, dapat digunakan untuk molekul yang besar dan kecil, serta mudah memperoleh kembali cuplikan. Kerugian HPLC, antara lain: hanya untuk senyawa yang dapat larut dalam fase gerak, mahal dan perlu perawatan.

Metode HPLC dapat digunakan untuk analisa kualitatif dan kuantitatif. Untuk analisa kualitatif dengan membandingkan kromatogram sample dengan kromatogram baku pembanding berdasarkan waktu retensinya. Sedangkan untuk analisa kuantitatif dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan :

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

Keterangan :

A = Peak area = Luas puncak

C = Konsentrasi

X = sample

P = Pembanding

Atau dapat pula ditentukan dengan menggunakan kurva kalibrasi larutan standar.

Berdasarkan kepolaran fasa geraknya, HPLC dibagi menjadi 2 macam yaitu :

a) Fase Normal HPLC

HPLC jenis ini secara esensial sama dengan kromatografi kolom. Meskipun disebut normal, ini bukan bentuk biasa dari HPLC. Kolom ini diisi dengan partikel silika yang sangat kecil dan pelarut nonpolar seperti heksan sebuah kolom sederhana memiliki diameter internal 4,6 mm (dan kemungkinan kurang dari nilai ini) dengan panjang 120 nm-250 nm.

Senyawa-senyawa polar dalam campuran melalui kolom akan melekat lebih lama pada silika yang polar dibanding dengan senyawa-senyawa non polar. Oleh karena itu, senyawa yang non polar kemudian akan lebih cepat melewati kolom. Apabila pasangan fasa diam lebih polar daripada fasa geraknya maka sistem ini disebut HPLC fase normal.

b) Fase Balik HPLC

Pada HPLC jenis ini, ukuran kolomnya sama, tetapi silika dimodifikasi menjadi non polar melalui pelekatan hidrokarbon dengan rantai panjang pada permukaannya secara sederhana baik berupa atom karbon 8 atau 18. Dalam kasus ini, akan terdapat interaksi yang kuat antara pelarut polar dan molekul polar dalam campuran yang melalui kolom. Interaksi yang terjadi tidak sekuat interaksi antara rantai-rantai hidrokarbon yang berlekatan pada silika (fasa diam) dan molekul-molekul polar dalam larutan. Oleh karena itu molekul-molekul polar akan lebih cepat bergerak melalui kolom. Sedangkan molekul-molekul non polar akan bergerak lambat karena interaksi dengan gugus hidrokarbon.

B. Instrumen KCKT

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi terdiri dari beberapa komponen antara lain:

1. Fasa Gerak

Fasa gerak dari HPLC merupakan zat cair yang disebut eluen atau pelarut. Dalam HPLC fasa gerak selain berfungsi untuk membawa komponen-komponen campuran menuju ke detektor, selain itu juga dapat berinteraksi dengan solut-solut. Oleh karena itu, fasa gerak dalam HPLC merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan proses pemisahan. Persyaratan zat cair yang akan digunakan sebagai fasa gerak sebagai berikut:

- a. Zat cair harus bertindak sebagai pelarut yang baik untuk cuplikan yang akan dianalisis
- b. Zat cair harus murni, untuk menghindari masuknya kotoran yang dapat mengganggu interpretasi kromatogram
- c. Zat cair harus jernih, untuk menghindari penyumbatan pada kolom. Biasanya pelarut disaring dengan saringan nylon berukuran diameter pori 0,45 μm
- d. Zat cair harus mudah diperoleh, murah, tidak mudah terbakar dan tidak beracun.
- e. Zat cair tidak kental dan harus sesuai dengan detector. Untuk detector UV, pelarut tidak boleh menyerap cahaya pada panjang gelombang yang dipakai.

Fasa gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu untuk menghindari partikel-partikel kecil. Selain itu adanya gas dalam fasa gerak juga harus dihilangkan, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis. Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik (komposisi fasa gerak tetap selama elusi) atau dengan cara bergradien (komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi) yang analog dengan pemrograman suhu pada kromatografi gas. Elusi bergradien digunakan

untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang luas. Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan buffer dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk pemisahan dengan fase normal, fasa gerak yang paling sering digunakan adalah campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan pelarut yang terklorisasi atau menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol. Pemisahan dengan fase normal ini kurang umum dibanding fase terbalik.

Pemilihan fase gerak merupakan hal yang kritis dalam keberhasilan pemisahan. Pemilihan fase gerak banyak dilandasi eksperimen *trial- and error* dengan berbagai jenis dan komposisi pelarut hingga diperoleh kromatogram yang diharapkan. Biasanya beberapa pelarut atau kombinasi pelarut dapat ditemukan untuk memberikan factor kapasitas yang cocok. Pemilihan pelarut juga bergantung pada factor selektivitas (α) untuk komponen cuplikan.

2. Pompa

Pompa dalam HPLC dianalogikan dengan jantung pada manusia yang berfungsi untuk mengalirkan fase gerak cair yang berisi serbuk halus. Digunakan pompa bertekanan tinggi dalam metode ini sebagai akibat penggunaan fasa gerak yang berupa zat cair yang akan sukar mengalir dalam kolom yang dipadatkan dengan serbuk halus. Oleh karena itu, agar zat cair dapat melewati kolom secara tepat maka dibutuhkan bantuan pompa yang bertekanan tinggi.

Pompa KCKT dapat dibagi menjadi dua jenis, yaitu pompa tekanan tetap dan pompa volume tetap. Pompa umumnya terbuat dari bahan gelas, baja, teflon dan batu nilam. Pompa yang digunakan harus memenuhi beberapa persyaratan, antara lain:

- a. Dapat memompakan fase gerak secara konstan (0,1–10 ml/menit)
- b. Dapat memberikan tekanan yang cukup tinggi sampai 600psi

- c. Memberikan fluktuasi tekanan yang cukup tinggi
- d. Memberikan gangguan (derau) yang rendah
- e. Bahan tahan korosi
- f. Cara kerja sederhana
- g. Cukup lambat terhadap pelarut-pelerut yang umum digunakan

Dikenal ada 3 jenis pompayang masing-masing memiliki kekurangan dan kelebihan yaitu pompa *reciprocating*, *displacement* dan *pneumatic*.

2. Injektor

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal atau eksternal.

Salah satu jenis penyuntik untuk memasukan sampel ke dalam sistem (kolom) kromatografi adalah penyuntik *loop*. Dalam prakteknya, *loop* tidak perlu diisi penuh, tapi bila tidak diisi penuh akan mengakibatkan lebih jeleknya presisi hasil eksperimen dan ketergantungan presisi tersebut kepada bagaimana si-operator menggunakan penyuntik. Oleh sebab itu terkadang factor ketidaktepatan pengukuran HPLC terletak pada keterulangan pemasukan cuplikan dalam packing kolom.

3. Kolom

Kolom HPLC biasanya terbuat dari stainless steel, akan tetapi ada juga yang terbuat dari gelas berdinding tebal mempunyai diameter internal 4-10 mm dan panjang 5-30 cm. kolom dibuat dengan diameter yang sangat kecil dengan tujuan agar: lebih peka, menghemat bahan pengembang, memperluas kemampuan detektor dan memungkinkan menganalisis sampel dengan jumlah yang kecil.

Kolom yang baik mempunyai daya pisah (resolusi) yang baik, resolusi adalah parameter yang menunjukkan apakah dua komponen terpisah dengan baik atau tidak. Pemisahan yang baik ditandai dengan puncak-puncak yang terpisah sampai garis dasar dan bentuk runcing. Daya pisah diidentifikasi sebagai jarak antara puncak dibagi rata-rata dan puncak yang diukur pada alas puncak. Kolom utama berisi fasa diam, tepat terjadinya pemisahan campuran menjadi komponen-komponen. Bergantung keperluannya kolom utama dapat digunakan untuk analisis atau preparatif setiap komponen yang keluar kolom ditampung pada tabung yang berbeda dan keluaran HPLC dihubungkan dengan fraction collector selain kolom utama dikenal pula kolom pengaman.

Kolom utama berisi fasa dian dan jenisnya bervariasi bergantung pada keperluan, misalnya dikenal kolom C8, C-18, cyanopropyl, dan penukar ion. Kolom utama untuk HPLC biasanya berukuran panjang berkisar antara 5-30 cm dan diameter dalam berkisar 4,5–10 mm. Kolom pengaman (*guard coloumn*) disebut juga pra-kolom karena letaknya sebelum sistem pemasukan cuplikan. Kolom ini berukuran pendek 5 cm dengan diameter 4,6 mm biasanya dipacking dengan partikel silika berukuran besar dari ukuran partikel kolom utama. Kolom pengaman mempunyai dua fungsi yaitu: menyaring kotoran yang terbawa oleh fasa gerak dan untuk menjenuhkan fasa gerak dalam rangka menghindarkan terjadinya erosi fasa diam oleh aliran pelarut.

Kolom merupakan bagian dari KCKT yang berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Keberhasilan atau kegagalan analisis bergantung pada pilhan kolom dan kondisi kerja yang tepat. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok :

a. Kolom analitik

Garis tengah dalam 2-6 mm, panjang bergantung pada jenis kemasan, untuk kemasan pelikel biasanya panjang kolom 50-100 cm, untuk kemasan mikropartikel berpori biasanya 10-30 cm.

b. Kolom preparatif

Umumnya bergaris tengah 6 mm atau lebih besar, dan panjang 25-100 cm.

Pengisi Kolom dapat berupa: Oktil Silan(C8), Okta Desil Silan (C18), silica, senyawa Sianida dan senyawa lain. Pertimbangan pemilihan Kolom, antara lain: sifat analit, isi Kolom, efisiensi Kolom, panjang Kolom, diameter kolom, tekanan dalam Kolom, serta informasi dari pustaka, kolega dan produsen

4. Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya. Idealnya detektor harus mempunyai sensitifitas yang baik terhadap semua komponen yang ada dalam eluat. Macam-macam detektor antara lain: detektor Fotometrik, detektor Elektrokimia, detektor Indeks Bias, detektor Konduktivitas.

Pertimbangan pemilihan detektor, antara lain: sensitivitas, linieritas, reproduibel, mudah dioperasikan, mudah dalam perawatan, rekorder atau integrator. Ketika linarut meninggalkan kolom, konsentrasinya di dalam kolom diukur oleh detektor dan sinyal yang terbentuk dimasukkan ke dalam alat perekam (rekorder). Integrator elektronik mengubah sinyal kromatografi menjadi bentuk angka secara otomatis dengan sangat tepat.

Idealnya, suatu detektor harus mempunyai karakteristik sebagai berikut:

- a. Mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduibel.
- b. Mempunyai sensitifitas yang tinggi, yakni mampu mendeteksi solut pada kadar yang sangat kecil.
- c. Stabil dalam pengopersiannya.
- d. Mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita.

- e. Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas (kisaran dinamis linier).
- f. Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak.

Ada dua jenis detektor yaitu detektor universal, yaitu detektor yang peka terhadap golongan senyawa apapun kecuali pelarutnya. Dan detektor selektif, adalah detektor yang peka terhadap golongan senyawa tertentu saja. Diantara detektor yang digunakan dalam KCKT adalah

1. Detektor Universal

a. Detektor Ultra Violet – Visible (Sinar Tampak)

Detektor UV terutama digunakan untuk pendeteksian senyawa-senyawa organik. Detektor UV dilengkapi dengan pengatur panjang gelombang, sehingga panjang gelombang UV yang digunakan dapat dipilih sesuai dengan jenis cuplikan yang diukur.

Detektor UV-Visible (uv-sinar tampak) paling banyak digunakan, karena sensitivitasnya yang baik mudah menggunakannya, tidak merusak senyawa yang di analisis, dan memungkinkan untuk melakukan elusi bergradien. Ada yang dipasang pada panjang gelombang tetap yaitu pada panjang gelombang 254 nm, dan ada yang panjang gelombangnya dapat dipilih sesuai dengan diinginkan antara 190-600 nm. Detektor dengan panjang gelombang variabel ini ada yang dilengkapi alat untuk memilih panjang gelombang secara otomatis dan dapat me-nol-kan sendiri (allto zero). Detektor jenis ini juga ada yang menggunakan drode erray (sebagai pengganti photo tube), sehingga dapat melakukan pembacaan absorban yang kontinyu pada berbagai panjang gelombang.

b. Detektor Indeks Bias

Detektor indeks bias memberi respons terhadap senyawa yang dianalisis apapun, termasuk pelarutnya sendiri. Prinsip dasar kerja detektor ini adalah perubahan indeks bias karena adanya komponen sampel dalam pelarut. Detektor ini bersifat tidak merusak (non-destruktif), sensitivitasnya

cukup tinggi (minimum 10^{-6} g) dan umumnya digunakan dalam pekerjaan preparatif. Dengan detektor ini tidak dapat dilakukan elusi bergradien. Detektor ini digunakan dalam kromatografi eklusi dan dalam analisis karbohidrat.

Hal yang harus diperhatikan dalam menggunakan detektor indeks bias :

- 1) Bila digunakan lebih dari satu pelarut, maka campuran dahulu hingga homogen dan bebaskan dari gas terlarutnya.
- 2) Setelah detektor dihidupkan, tunggu beberapa lama sebelum digunakan sampai detektor stabil.
- 3) Bila digunakan lebih dari satu detektor yang dipasang berurutan, maka tempatkanlah detektor indeks bias pada urutan terakhir.
- 4) Untuk saluran pembuangan, gunakanlah selang teflon berdiameter dalam (inner diameter) yang besar tapi pendek.
- 5) Tempatkan detektor pada kondisi suhu yang dipelihara tetap.
- 6) Jaga agar sel indeks bias selalu bersih.
- 7) Sel pembanding harus diisi dengan pelarut yang telah dilewatkan melalui kolom.

- c) Detektor Spektrometer Massa
- d) Detektor Spektrometer Inframerah

2. Detektor Selektif

- a). Detektor Fluoresensi

Didasarkan kepada prinsip bahwa molekul-molekul tertentu dapat menyerap energi pada panjang gelombang yang lebih pendek membentuk suatu keadaan tereksitasi dan kemudian secara hampir bersamaan turun kembali ke keadaan dasar (*ground state*) dengan memancarkan energi pada panjang gelombang yang lebih panjang.

- b). Detektor Konduktivitas Listrik

Detektor elektrokimia biasanya didasarkan pada daya hantar listrik (konduktometri) dan polarografi. Detektor jenis konduktometri biasanya digunakan untuk mendeteksi solut-solut yang dapat mengalami reaksi

redoks baik senyawa organik maupun anorganik. Adapun persyaratan detektor yaitu: cukup sensitif, stabilitas, dan keterulangan tinggi, tidak erusak cuplikan, respon linier terhadap solut, reliabilitas tinggi dan mudah digunakan.

Idealnya, suatu detektor harus mempunyai karakteristik sebagai berikut :

1. Mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reprodusibel
2. Mempunyai sensitifitas yang tinggi, yakni mampu mendeteksi solut pada kadar sangat kecil
3. Stabil dalam pengoperasiannya
4. Mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita
5. Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas
6. Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fasa gerak

C. FASE DIAM DAN FASE GERAK

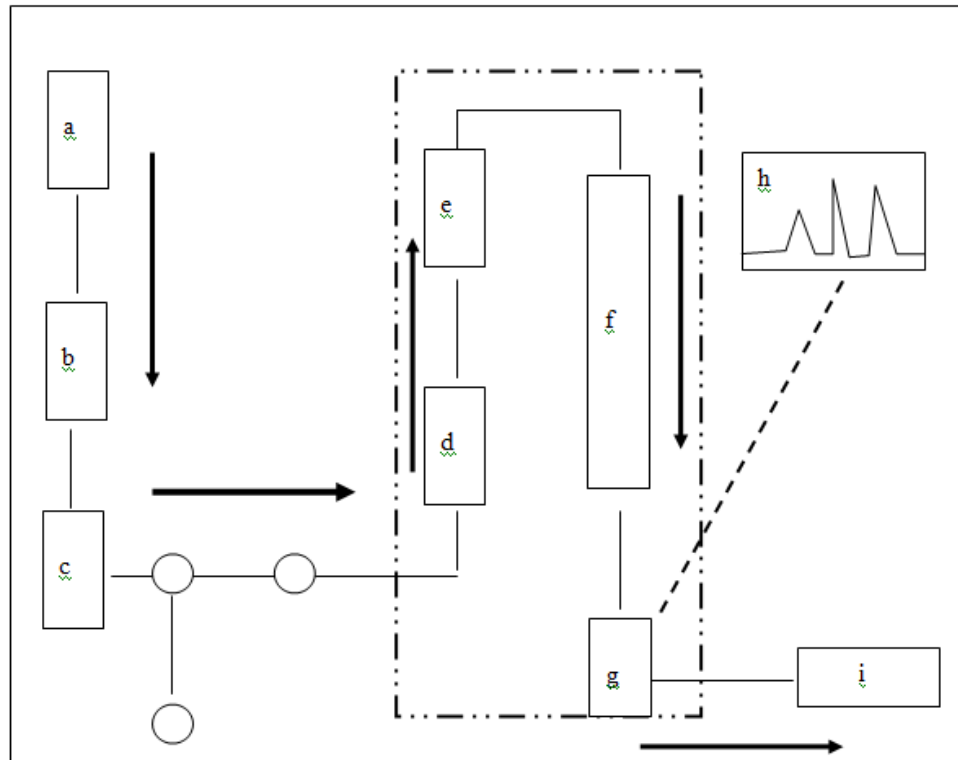
Fase diam dapat berupa zat padat yang berfungsi sebagai medium yang menyerap atau permukaan zat cair yang terdapat dalam sejenis zat padat. Fase diam yang digunakan adalah: Oktal Silan(C8), Okta Desil Silan (C18), silica, senyawa Sianida dan senyawa lain.

Fase diam dan fase gerak yang digunakan tergantung pada mekanisme pemisahan yang dipilih. Jenis mekanisme pemisahan dipilih berdasarkan sifat-sifat dan karakteristik dari komponen yang akan dipisahkan.

Beberapa ketentuan yang harus diperhatikan dalam pemilihan fase diam adalah: Sifat kimia sampel, ukuran partikel dasar penyusun kolom dan dimensi kolom

D. SKEMA INSTRUMENTASI

Secara skematik penggunaan alat KCKT dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Keterangan:

a. Fase gerak

b. Penyaring

c. Sistem pompa bertekanan tinggi

d. Injektor

e. Pengatur suhu

f. Kolom Analisis

g. Detektor

h. Rekorder

i. Penampung Eluat

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

- HPLC
- *Syringe*
- labu tentukur
- pelarut (metanol:air)
- membrane selulosa nitrat
- asam asetat glacial 0,4 %
- minuman/produk yang mengandung kofein dan Parasetamol
- kolom C₁₈
- pipet Volume
- kofein dan Parasetamol standar
- Membran PTFE
- membrane Nylon
- penyaring vacum

b. Prosedur Kerja

1) Pembuatan larutan standar kofein

- Ke dalam labu tentukur 50-ml, masukkan kofein yang telah ditimbang seksama 50,0 mg.
- Encerkan sampai tanda dengan pelarut campur.
- Kocok kofein sampai larut sempurna, buat larutan standar dengan konsentrasi 40 dan 100 ppm.
- larutan diawaudarakan/degassing dengan disonikasi dan disaring
- Biarkan 5 menit sebelum diinjeksikan ke dalam HPLC.
- injeksikan larutan standar
- Lakukan triplo. Amati hasil kromatogram.

2) Pembuatan larutan standar Parasetamol

- Ke dalam labu tentukur 50-ml, masukkan Parasetamol yang telah ditimbang seksama 50,0 mg.
- Encerkan sampai tanda dengan pelarut campur.
- Kocok kofein sampai larut sempurna, buat larutan standar dengan konsentrasi 40 dan 100 ppm.
- larutan diawaudarakan/degassing dengan disonikasi dan disaring
- Biarkan 5 menit sebelum diinjeksikan ke dalam HPLC.
- injeksikan larutan standar
- Lakukan triplo. Amati hasil kromatogram.

- 3) Pembuatan larutan standar campuran Cofein dan Parasetamol
 - Ke dalam labu tentukur 50-ml, masukkan masing-masing kofein dan Parasetamol sebanyak 100 ppm.
 - Encerkan sampai tanda dengan pelarut campur, Kocok sampai larut sempurna,
 - larutan diawaudarakan/degassing dengan disonikasi dan disarin
 - Biarkan 5 menit sebelum diinjeksikan ke dalam HPLC
 - injeksikan larutan standar
 - Lakukan triplo. Amati hasil kromatogram.

- 4) Pembuatan larutan sampel kofein & Parasetamol
 - Ke dalam labu tentukur 50-ml, masukkan sampel yang telah ditimbang seksama mg.
 - Encerkan sampai tanda dengan pelarut campur.
 - Kocok kofein sampai larut sempurna, buat larutan standar dengan konsentrasi 40 dan 100 ppm.
 - larutan diawaudarakan/degassing dengan disonikasi dan disaring
 - Biarkan 5 menit sebelum diinjeksikan ke dalam HPLC.
 - injeksikan larutan standar
 - Lakukan triplo. Amati hasil kromatogram.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

- 1) Kolom : ODS
- 2) Detektor : UV λ nm
- 3) Volume injeksi : 20 μ l
- 4) Aliran :ml/menit
- 5) Fase gerak :

b. Data Penimbangan

c. Data Hasil Cofein

No	Konsentrasi	Rt (menit)	Luas Area	
1.				
2.				
3.				
Rata-rata				
SD				
SDR				

d. Data Hasil Parasetamol

No	Konsentrasi	Rt (menit)	Luas Area	
1.				
2.				
3.				
Rata-rata				
SD				
SDR				

e. Data Hasil campuran Baku Cofein dan Parasetamol

No	Konsentrasi Cofein	Rt (menit)	Luas Area	Konsentrasi Parasetamol	Rt (menit)	Luas Area
1						
2						
3						
Rata-rata				Rata-rata		
SD				SD		
SDR				SDR		

f. Data Hasil sampel

No	Cofein		Parasetamol	
	Rt (menit)	Luas Area	Rt (menit)	Luas Area
1				
2				
3				
Rata-rata				
SD				
SDR				

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Bagaimana prinsip pemisahan pada KCKT
- b. Gambarkan instrumentasi KCKT
- c. Apa saja syarat pompa yang dapat digunakan pada KCKT
- d. Apa saja syarat detektor yang dapat digunakan pada KCKT
- e. Apa yang dimaksud dengan isokratik dan gradient?

8. Daftar Pustaka

- a. Anonim, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, Depkes RI, 1995, Jakarta.
- b. Gholib, Ibnu dan Rohman, Abdul. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- c. Khopkar. S. M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.
- d. Harmita, K, Harahap, Y, dan Supandi .2019. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*. Jakarta : PT.ISFI Penerbitan.
- e. Stahl E. Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi. diterjemahkan oleh Padmawinata K, Soediro I, Penerbit ITB, 1985. Bandung.
- f. IAPSD-Laboratory Operations Project, Laboratorium terpadu AUSAID Tes 507, *Menggunakan Teknik-teknik Kromatografi*, 2003, Institut Pertanian Bogor.

PRAKTIKUM 11: KROMATOGRAFI GAS / GC

1. Kompetensi Dasar

- a. Memahami prinsip kerja Alat Kromatografi Gas
- b. Memahami cara Analisis dengan Alat Kromatografi Gas

2. Indikator Capaian

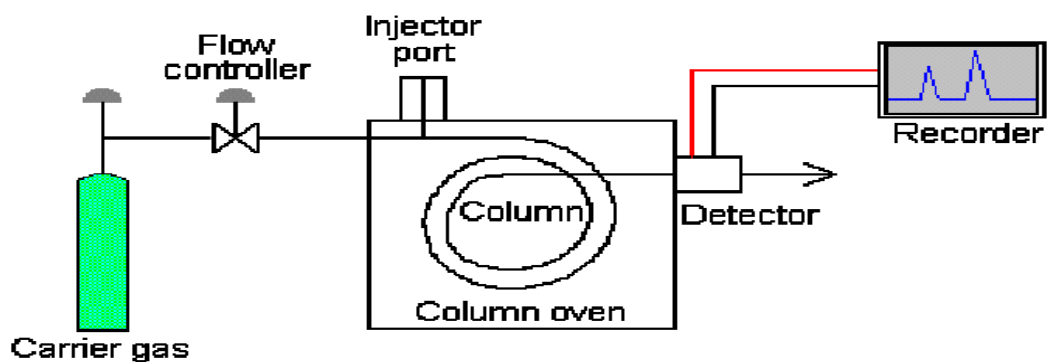
- a. Mampu menjelaskan prinsip kerja Alat Kromatografi Gas
- b. Mampu melakukan Analisis dengan Alat KG

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami Cara kerja Alat Kromatografi Gas

4. Uraian Teori

Saat ini, kromatografi gas memegang peranan penting dalam analisa hasil-hasil minyak bumi, lemak/minyak dan beberapa bahan baik yang berasal dari alam maupun sintetis. Proses kromatografi gas didasarkan atas distribusi suatu zat terlarut (*Solute*) diantara gas yang bergerak/gas pembawa (*Carrier gas*) dan pada fase cair yang diletakkan pada zat pendukung (*Support*) didalam suatu kolom yang panjang. Peralatan kromatografi gas mempunyai skema yang sederhana seperti yang digambarkan dibawah ini:



Keterangan gambar:

- a. *Carrier gas* = Tangki gas pembawa
- b. *Flow controller* = Kunci/kontrol tekanan
- c. *Injector port* = Tempat penginjeksian

- d. *Coulumn* = kolom
- e. *Coulomn Oven* = Oven Kolom
- f. Detektor
- g. Recorder

Gas pembawa yang digunakan harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

- a. Harus inert, tidak bereaksi dengan sampel dan fase diamnya
- b. Murni dan mudah diperoleh serta murah
- c. Sesuai/cocok untuk detektor
- d. Harus mengurangi difusi gas

Keuntungan Kromatografi Gas, antara lain:

- a. Aliran fase gerak gas kecepatannya dapat dikontrol
- b. Pencampuran uap sampel kedalam aliran fase mobil mudah
- c. Pemisahan fisik di dalam kolom, jenis, panjang dan temperaturnya dapat diatur
- d. Banyak macam detektor yang dapat dipakai
- e. Dapat digabungkan dengan instrumen lain

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

- | | |
|--------------------|------------------------|
| - Gas Kromatografi | - Alat – alat gelas |
| - Kolom | - Gas Nitrogen |
| - Syringe | - Rekorder |
| - Labu tentukur | - Sampel (zat volatil) |

b. Prosedur Kerja

- Siapkan instrumen GC sesuai dengan protap.
- Injeksikan salah satu komponen yang terkandung dalam sampel sebagai standar, tentukan waktu retensi masing standar dan luas area dibawah kurva.

- Injeksikan sampel volatil yang mengandung zat yang sama dengan standar
- Tentukan
 - a. waktu retensi dan luas area di bawah kurva
 - b. identifikasikan sampel dengan membandingkannya dengan standar yang digunakan di atas
 - c. Hitung kadar masing-masing komponen yang terdapat dalam sampel. Dengan cara membandingkan luas area dibawah kurva dari sampel dengan luas area dibawah kurva dari standar.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Bagaimana prinsip pemisahan pada GC?
- b. Apakah yang dimaksud dengan gas pembawa? Sebutkan syarat-syaratnya
- c. Sebutkan keuntungan penggunaan kapiler kolom pada GC
- d. Sebutkan syarat-syarat fase diam pada GC
- e. Sebutkan kelebihan dan kekurangan instrument HPLC dan GC?

8. Daftar Pustaka

- a. Gholib, Ibnu dan Rohman, Abdul. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- b. Khopkar. S. M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.
- c. Stahl E. Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi. diterjemahkan oleh Padmawinata K, Soediro I, Penerbit ITB, 1985. Bandung.
- d. IAPSD-Laboratory Operations Project, Laboratorium terpadu AUSAID Tes 507, *Menggunakan Teknik-teknik Kromatografi*, 2003, Institut Pertanian Bogor.

PRAKTIKUM 12:
SDS-PAGE (SDS POLYACRILAMIDE GEL ELEKTROFORESIS)

1. Kompetensi Dasar

- a. Memahami prinsip SDS-PAGE
- b. Memahami cara preparasi sampel dan Analisis dengan SDS-PAGE

2. Indikator Capaian

- a. Mampu menjelaskan prinsip SDS-PAGE
- b. Mampu memahami cara preparasi sampel dan Analisis dengan SDS-PAGE

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu memahami Cara kerja Alat SDS-PAGE dan dapat mengidentifikasi berat molekul dari suatu sampel protein.

4. Uraian Teori

Protein-protein atau asam nukleat dapat dipisahkan satu dari yang lain atas dasar perbedaan muatan listrik. Pada hari ini, Anda akan diperlihatkan hasil elektroforesis DNA dengan teknik elektroforesis agarose dan memisahkan protein-protein yang sudah diisolasi dari darah dengan SDS-PAGE.

Elektroforesis agarose dapat digunakan untuk memisahkan asam nukleat (atau fragmennya) yang bermuatan negatif sesuai dengan arus listrik. Pada sistem elektroforesis tersebut, agarose merupakan bahan media yang berfungsi sebagai alas/ medium pemisah yang diletakkan antara anode dan katode alat elektroforesis. Medium pemisah tidak bergerak (fasa stationer). Molekul yang ingin dipisahkan diletakkan pada medium pemisah dan dibawa sesuai dengan muatan listrik oleh karena medium pemisah direndam dengan larutan ionik. Molekul yang besar bergerak lebih lambat dari pada molekul lebih kecil.

Gel agarose disiapkan dengan ethidium bromide yang mengikat dengan DNA (*intercalater*) dan diperlihatkan warna oranye kalau disinarkan dengan

cahaya UV. Protein-protein dapat dipisahkan berdasarkan berat molekul. SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis*) adalah teknik elektroforesis yang sering digunakan dalam analisis protein di laboratorium.

Sampel protein denaturasi (dipanaskan) dan dicampur dengan SDS (yang merupakan detergen yang anionik) dengan akibat kompleks protein-detergen itu bermuatan negatif dan protein yang lebih besar mempunyai muatan negatif yang lebih besar.. Kompleks protein-detergen itu akan dibawa oleh medan listrik ke arah kutub positif (anoda). Gel akrilamide berfungsi sebagai dasar atau alas atas gerakan sampel protein.

Konsentrasi akrilamide menentukan ukuran pori-pori gel dan ukuran pori-pori gel menentukan jarak yang ditempuh oleh kompleks protein-SDS. Jadi berapa faktor harus ditentukan untuk memaksimalkan pemisahan protein-protein melalui teknik SDS-PAGE (antara lain: kadar SDS, konsentrasi gel akrilamide dan ukuran gelnya, kemurnian sampel protein dan jumlah sampel yang diletakkan pada gel; voltage yang digunakan pada alat elektroforesis dan selama medan listrik dihidupkan).

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

- **Persiapan Gel**

Alat: *Gel caster*, Kaca, Penjepit kaca

Bahan

a. *Separating gel* 12,5%, yang mengandung (per slap) :

1)	Acrylamide 30%	2063 μ l
2)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1250 μ l
3)	H ₂ O	1635 μ l
4)	SDS 10%	50 μ l
5)	APS 10%	50 μ l
6)	TEMED	10 μ l

b. *Stacking gel*, yang mengandung (per slap) :

1)	Acrylamide 30%	257,5 μ l
----	----------------	---------------

- | | | |
|----|---------------------|---------------|
| 2) | 1 M Tris-HCl pH 6,8 | 312,5 μ l |
| 3) | H ₂ O | 662,5 μ l |
| 4) | SDS 10% | 12,5 μ l |
| 5) | APS 10% | 3,75 μ l |
| 6) | TEMED | 2,5 μ l |

c. Acrylamide 30% (50 ml):

- | | | |
|----|------------------|---------|
| 1) | Acrylamide | 14,5 gr |
| 2) | Bis Acrylamide | 0,25 gr |
| 3) | H ₂ O | 50 cc |

d. 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (50 ml):

- | | | |
|----|----------|-----------|
| 1) | Tris HCl | 11,823 gr |
| 2) | Aquades | 50 cc |

e. 1 M Tris-HCl pH 6,8 (20 ml):

- | | | |
|----|----------|-----------|
| 1) | Tris-HCl | 3,1528 gr |
| 2) | Aquades | 20 cc |

f. SDS 10% (10 ml):

- | | | |
|----|---------|-------|
| 1) | SDS | 1 gr |
| 2) | Aquades | 10 cc |

g. APS 10% (1ml) : APS

		0,1 gr
--	--	--------

- **Persiapan Sampel**

Alat : Appendorf 1,5 ml

Bahan

· Sampel protein

· *Tracking dye / RSB* :

- | | | |
|----|------------------------|--------|
| 1) | Tris HCl pH 6,8 | 1 ml |
| 2) | Gliserol | 0,8 ml |
| 3) | SDS 10% | 1,6 ml |
| 4) | β mercaptoetanol | 0,4 ml |
| 5) | bromophenol blue 1% | 0,2 ml |
| 6) | Aquades | 4 ml |

- **Elektroforesis Gel**

Alat

Alat elektroforesis yang memberikan tegangan listrik \pm 120V

Bahan

Running Buffer (1000 ml) :

1)	Glicyne	14,2	gr
2)	Tris Base	3,03	gr
3)	Aquades steril	1000	ml
4)	SDS	1	gr

- **Staining dengan Coomasie Brilliant Blue**

Alat

1 buah wadah plastik bertutup ukuran 10x10x10 cm

Bahan

Staining Solution (100 ml) :

1)	Coomassie Brilliant Blue R250	0,1	gr
2)	Methanol	40	cc
3)	As. Ac. Glacial	10	cc
4)	Aquades	100	cc

- **Destaining**

Alat: 1 buah wadah plastic bertutup ukuran 10x10x10 cm

Bahan

Destaining Solution (100 ml) :

1)	Methanol	20	cc
2)	As. Ac. Glacial	10	cc
3)	Aquades	100	cc

b. **Prosedur Kerja**

1). Persiapan Gel

- Alat dan bahan pembuatan gel disiapkan. Kaca dipasang pada penjepitnya.
- Campuran bahan *separating gel* disiapkan sesuai dengan resep dan konsentrasinya.
- Campuran *separating gel* dihomogenkan dengan cepat agar tidak segera mengeras.
- Campuran *separating gel* dimasukkan pada *gel caster* dengan bantuan pipet, diikuti dengan pemberian aquades agar permukaan gel rata dan oksigen tidak ada.
- Ruang disisakan untuk *stacking gel*.
- Setelah *separating gel* mengeras, sisa aquades dibuang.
- Campuran *stacking gel* disiapkan.
- Campuran *stacking gel* dihomogenkan dengan cepat.
- Campuran *stacking gel* dituang di atas *separating gel* dan sisir (*comb*) segera dipasang diatas *stacking gel*.

- Gel dibiarkan hingga mengeras.
- Setelah gel mengeras, kaca dilepas dari penjepitnya.
- Gel pada kaca dipasang pada alat elektroforesis dan *running buffer* dituang.

2). Persiapan Sampel

- Sampel protein dan *tracking dye* (RSB) disiapkan.
- 20 μ l sampel protein dan 20 μ l *tracking dye* (RSB) dicampur, dimasukkan dalam *ependorf*.
- Sampel direbus pada suhu 100°C selama 5 menit.
- Sampel didinginkan pada suhu ruangan.

3). Elektroforesis Gel

- Sampel protein dimasukkan ke dalam gel melalui ujung atas *stacking gel* sebanyak 2 μ l / sumur.
- *Power supply* dinyalakan.
- Sampel diproses atau *running* dengan memberikan tegangan listrik sebesar 120 V selama 60-90 menit.
- Gel dilepas dari kacanya.

4). Staining dengan Coomasie Brilliant Blue

- Gel direndam dalam staining solution *Coomasie Brilliant Blue R - 250*.
- Rendaman gel dalam staining solution *Coomasie Brilliant Blue R - 250* diletakkan di dalam shaker selama 20 - 30 menit.

5). Destaining

- Pewarna pada gel dihilangkan dalam rendaman destain solution \pm 1 – 2 jam sambil tetap di shaker.
- Lakukan *destaining* semalam di atas *shaker* sampai gel kelihatan bersih.
- Gel siap discan dan dianalisa hasilnya.
- Hitung BM protein pada band protein yang tampak pada gel menggunakan grafik regresi linear.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Bagaimana prinsip pemisahan pada SDS PAGE
- b. Apa beda separating gel dan Stacking gel
- c. Informasi apa saja yang bias kita dapatkan sengan menggunakan SDS PAGE
- d. Sebutkan fungsi masing-masing dari Akrilamida, Temed, ammonium persulfat pada analisis dengan SDS PAGE

8. Daftar Pustaka

- a. Campbell, N.A., J.B. Reece, L.G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Terj. dari *Biology*; oleh Lestari, R. *dkk*. Erlangga, Jakarta: xxi + 438 hlm.
- b. Davis, L., M. Kuehl, & J. Battey. 1994. *Basic methods: Molecular biology*. 2nd ed. Appleton & Lange, Norwola: xii + 777 hlm.
- c. Martin, R. 1996. *Gel electroforesis: Nucleid acids*. Bros Scientific Publishers Ltd., Oxford: xiii + 173 hlm.