

Nama: Sabila Azzahra

NPM: 1914121032

PS: Agroteknologi

MK. Teknik Lab. Tanaman Hortikultura

Resume Materi

HPLC

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) atau KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) merupakan metode analisis sampel yang kerap digunakan dalam industri maupun laboratorium analisis farmasi. **HPLC atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi** adalah salah satu teknik kromatografi untuk zat cair yang biasanya disertai dengan teknik tekanan tinggi. HPLC sendiri mempunyai prinsip dasar yaitu pemisahan molekul berdasarkan perbedaan afinitas zat padat tertentu. Cairan yang akan dipisahkan merupakan fasa cair dan zat padatnya adalah fase diam. Pemisahan tersebut terjadi saat sampel bergerak melewati fase diam (dapat berupa zat padat atau cair) karena terbawa oleh fase gerak (dapat berupa zat cair atau gas). Analisa kuantitatif dengan teknik HPLC didasarkan pada pengukuran luas area puncak analit dengan dalam kromatogram dibandingkan dengan luas area larutan standar. Perbedaan HPLC dengan metode kromatografi lainnya adalah penggunaan zat cair sebagai fase geraknya. Sampel yang telah dilarutkan dapat dipisahkan dan dihitung konsentrasi zat spesifik yang terkandung di dalamnya. Berbeda dengan kromatografi lainnya seperti kromatografi kolom tradisional yang memanfaatkan gravitasi agar fase gerak dapat melalui fase diam. HPLC sendiri menggunakan pompa bertekanan tinggi untuk mengalirkan fase gerak menuju kolom fase diam.

HPLC sendiri memiliki skema alat atau komponen utama yang terdiri dari fase gerak dan reservoir pelarut, pompa, injektor, sampel, kolom HPLC, detektor, dan pengolahan data.

1. Fase gerak pada HPLC harus menggunakan pelarut dengan kemurnian sangat tinggi. Idealnya, pelarut khusus yang memang sudah memenuhi standard untuk HPLC dipergunakan untuk hasil yang lebih akurat. Reservoir pelarut merupakan wadah penyimpanan fase gerak, biasanya berbentuk botol kaca dengan selang penghubung.
2. Pompa yang digunakan dalam HPLC haruslah pompa bertekanan tinggi agar dapat mendorong fase gerak dalam reservoir menuju kolom fase diam dan melewati detektor. Tekanan yang digunakan beragam tergantung dari dimensi kolom, ukuran partikel fase diam, serta laju alir dan komposisi dari fase gerak yang akan dipakai.
3. Injektor merupakan tempat masuknya sampel ke dalam sistem HPLC. Proses injeksi dapat dilakukan secara manual dengan *syringe* atau dengan menggunakan sistem injeksi otomatis. Injektor pada HPLC harus dapat menampung sampel cairan dalam kisaran volume 0.1-100 mL.
4. Sampel yang dapat dianalisis menggunakan HPLC harus bersifat bening dan tidak ada endapan, untuk itu preparasi sampel diperlukan sebelum dianalisis, misalnya dengan melakukan filtrasi sampel. Preparasi lain dapat pula dilakukan sesuai kebutuhan seperti mengatur konsentrasi sampel, desalting, dan lain-lain.
5. Aktivitas utama dalam HPLC terjadi di dalam kolom sebagai fase diam. Di dalam kolom akan terjadi pemisahan komponen sampel yang kemudian dapat dihitung waktu retensi masing-masing komponennya oleh detektor. **Waktu retensi** adalah waktu yang dibutuhkan oleh senyawa komponen sampel untuk melewati kolom menuju detektor. Waktu retensi dihitung dari saat sampel diinjeksikan hingga puncak pembacaan maksimum pada detektor. Senyawa yang berbeda akan memiliki waktu yang berbeda sehingga masing-masing konsentrasinya dapat dihitung.
6. Detektor berfungsi untuk mendeteksi keberadaan komponen yang telah melewati kolom dan memberikan sinyal elektronik pada pengolah data.
7. Pada pebolahan data akan menampilkan output visual hasil analisis yang terbaca oleh detektor dalam bentuk kromatogram. Kromatogram menggambarkan jumlah komponen pada sampel dilihat dari jumlah puncak (*peak*) yang dihasilkan. Konsentrasi komponen yang hendak dianalisis dapat

dihitung dengan membandingkan luas area *peak* komponen dengan luas area *peak* serta konsentrasi standar.

Setiap metode pasti memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. Kelebihan HPLC adalah mampu memisahkan molekul dan campuran dengan daya pecah tinggi, dapat digunakan berbagai macam detektor dengan kecepatan tinggi, kolom dapat digunakan kembali, dan waktu analisis sampel cukup singkat. Sedangkan untuk kekurangan dari HPLC adalah harga alat yang relatif mahal atau tinggi, sering ada larutan tertinggal pada injektor, dan ukuran kolom yang kecil memungkinkan tersumbat kotoran.

HPLC juga banyak digunakan untuk menganalisis suatu hasil produk pertanian seperti halnya menentukan glukosa, fruktosa, serta sukrosa pada salah satu buah, yaitu goji berry secara simultan. Pada penelitian metode HPLC sederhana, cepat, sensitif, selektif, dan andal menggunakan ELSD yang dikembangkan dan divalidasi dapat menentukan glukosa, fruktosa, dan sukrosa secara simultan dalam sampel komersial goji berry. Metode ini memungkinkan pemisahan semua analit dalam waktu singkat (15 menit). Selain itu, metode yang dikembangkan memiliki linearitas, presisi, dan akurasi yang baik untuk evaluasi kuantitatif simultan fruktosa, glukosa, dan sukrosa dalam buah *L.barbarum*.

GC-MS

Kromatografi adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam untuk memisahkan komponen yang berada pada larutan. Kromatografi gas (GC) memiliki bidang aplikasi yang sangat luas. Namun, area penggunaan yang utama adalah dalam pemisahan dan analisis campuran multi komponen seperti minyak atsiri, hidrokarbon, dan pelarut. Prinsip kromatografi gas adalah adsorpsi dan partisi. Dalam kelompok metode berbasis kromatografi, kromatografi gas (GC) adalah salah satu teknik yang paling banyak digunakan. GC-MS telah menjadi alat yang sangat direkomendasikan untuk memantau dan

melacak polutan organik di lingkungan. GC-MS secara eksklusif digunakan untuk analisis ester, asam lemak, alkohol, aldehida, terpen dll. Sebagai teknologi yang unik dan kuat, GC-MS memberikan kesempatan langka untuk melakukan analisis senyawa baru untuk karakterisasi dan identifikasi senyawa yang disintesis atau diturunkan.

Pada prinsipnya, ada dua blok utama dalam instrumen GCMS, yaitu GC dan MS. GC menggunakan kolom kapiler yang tergantung pada dimensi kolom (panjang, diameter, ketebalan film) serta sifat fase. Perbedaan sifat kimia antara molekul-molekul yang berbeda dalam suatu campuran dapat dipisahkan dengan melewati sampel sepanjang kolom. Molekul-molekul tersebut memerlukan waktu yang berbeda (waktu retensi) untuk keluar dari GC. Berdasarkan data waktu retensi yang sudah diketahui dari literatur, bisa diketahui kandidat senyawa apa saja yang ada dalam sampel. Hasil yang didapat dari GC kemudian dimasukkan dalam instrumen MS, sehingga dapat diperoleh informasi mengenai massa molekul relatif dari senyawa sampel tersebut. Setiap senyawa memiliki keunikan, yaitu memiliki waktu retensi dan berat molekul yang berbeda. Tidak semua senyawa dapat dianalisis dengan GCMS. Umumnya, senyawa yang dapat dianalisis dengan GCMS adalah senyawa yang dapat diuapkan (<350°C) dan tidak terdekomposisi, contohnya sebagian besar solvent, pestisida, flavor, hidrokarbon, obat-obatan, dan lain-lain.

Keunggulan instrumen GCMS adalah resolusi dan sensitivitas tinggi, spesifik, fleksibel (mudah digabung dengan instrumen fisika/kimia lainnya), dapat memberikan informasi struktur, dan efisien (membutuhkan jumlah sampel sedikit, waktu pemisahan yang dibutuhkan relatif cepat). Kelemahan dari GCMS adalah kurang cocok untuk analisa senyawa labil pada suhu tinggi karena akan terdekomposisi pada awal pemisahan. Komponen atau instrumen dari GC-MS terdiri dari gas pengangkut, tempat injeksi, kolom, detektor, oven, dan rekorder.

Dalam bidang pertanian, metode GCMS banyak digunakan untuk menganalisis POPs (Polutan Organik Persisten) seperti pestisida yang terkandung dalam bahan

pangan, bahan kimia industri, produk yang tidak sengaja dihasilkan PCDD (*Poly Chlorinated Dibenzop-Dioxins*), PCDF (*Poly Chlorinated Dibenzo Furans*), PCB (*Poly Chlorinated Biphenyl*), karakterisasi tanaman (lignin, inositol, lemak, asam lemak, karbohidrat, flavonoid, antioksidan), metabolomics (fitohormon), analisa flavor, dan lain sebagainya. Selain itu, pengaplikasian GC-MS dapat diaplikasikan pada **forensik dan kasus kriminal** (GC-MS dapat menganalisis partikel dari tersangka untuk mengkorelasikan keterlibatannya dalam kasus tersebut), **pemantauan lingkungan**, **analisis makanan, minuman, rasa dan aroma** (GC-MS juga digunakan untuk mendeteksi dan mengukur kontaminan, pembusukan dan pemalsuan makanan, minyak, mentega, ghee yang dapat berbahaya dan harus dikontrol dan diperiksa sebagaimana diatur oleh lembaga pemerintah), **deteksi keamanan dan kimia agen perang** (GCMS merupakan bagian penting dari unit analisis kimia), **aplikasi kedokteran dan farmasi** (GC-MS dapat menentukan senyawa dalam urin bahkan dalam konsentrasi kecil), **deteksi biologis dan pestisida, analisis petrokimia dan hidrokarbon, toksikologi klinis, aplikasi industri** (GC-MS digunakan dalam industri untuk analisis pelarut aromatik, gas anorganik, alkohol amino dalam air, pengotor dalam stirena, glikol, diol, xilena, alergen dalam kosmetik, dll.), dan **aplikasi energi dan bahan bakar**.

Prinsip kerja instrumen GC MS, yaitu sampel yang diinjeksikan ke dalam Kromatografi Gas akan diubah menjadi fasa uap dan dialirkan melewati kolom kapiler dengan bantuan gas pembawa. Pemisahan senyawa campuran menjadi senyawa tunggal terjadi berdasarkan perbedaan sifat kimia dan waktu yang diperlukan bersifat spesifik untuk masing-masing senyawa. Pendeteksian berlangsung di dalam Spektroskopi Massa dengan mekanisme penembakan senyawa oleh elektron menjadi molekul terionisasi dan pencatatan pola fragmentasi yang terbentuk dibandingkan dengan pola fragmentasi senyawa standard yang diindikasikan dengan prosentase Similarity Index (SI). Pada prosedur penggunaan instrumen GC MS, pilih metode yang sesuai dengan sampel yang akan dianalisa, setelah instrument siap sampel diinjek sebanyak volume yang telah ditentukan. Ketika waktu analisa berakhir, puncak yang dihasilkan

pada kromatogram akan dicocokkan dengan senyawa yang ada pada library sehingga dapat diketahui kandungan senyawa di dalam sampel.

AAS

AAS (Atomic Absorption Spectroscopy) atau spektrofotometri serapan atom adalah suatu metoda analisis untuk penentuan unsur-unsur logam dan metaloid yang berdasarkan pada penyerapan (absorpsi) radiasi oleh atom bebas unsur tersebut. Perkembangan yang sudah dicapai hingga kini meliputi instrument, sumber radiasi resonans, nyala yang lebih stabil, suhu pengatoman yang lebih tinggi, efisiensi pengatoman lebih tinggi, dan sebagainya serta usaha untuk dapat menentukan lebih banyak unsur dari sistem periodik. Alat ini dalam bidang pertanian banyak digunakan untuk mengukur atau mengetahui unsur hara pada suatu pupuk atau lainnya. selain itu, alat ini juga dapat digunakan dalam bidang kesehatan, seperti halnya mengetahui unsur-unsur dalam suatu obat ataupun analisa terhadap tumbuhan untuk kesehatan.

Banyak penentuan unsur-unsur logam yang sebelumnya dilakukan dengan metoda polarografi, kemudian dengan metoda spektrofotometri, sekarang banyak diganti dengan metoda AAS Flame. Analisis yang dapat dilakukan dengan metoda AAS Flame adalah mulai dari analisis jumlah runutan sampai dengan analisis komponen utama. Metoda AAS Flame mempunyai segi-segi yang baik sebagai berikut: Spesifik dan cukup ekonomis, batas (limit) deteksi yang rendah. dari larutan yang sama, beberapa unsur yang berlainan dapat diukur. Pengukuran dapat langsung dilakukan terhadap larutan sampel, output data (absorbance) dapat dibaca langsung. dapat diaplikasikan kepada banyak jenis unsur dalam banyak jenis sampel. dan batas kadar-kadar yang dapat ditentukan adalah amat luas (sub-ppm hingga %).

Prinsip kerja analisa menggunakan SSA yaitu suatu sampel dibuat dalam bentuk larutan dan dikabutkan, lalu disalurkan ke bagian burner kemudian mengalami d atomisasi. Selanjutnya direaksikan dengan sumber energi radiasi maka atom pada

keadaan dasar membutuhkan energi yang besar dan untuk mendapatkannya atom tersebut menyerap energi dari sumber cahaya yang ada pada alat SSA. Dalam SSA sendiri terdapat komponen-komponen utama yang mendukung kerja SSA itu sendiri, yaitu lampu katoda yang terdiri dari mono logam dan multi logam, tabung gas, ducting, kompresor, Burber, buangan pada AAS, unit atomasi yang terdiri dari atomisasi nyala dan atomisasi dengan elektrotermal, monokromator, dan detektor.

Teknik analisa pada SSA terdiri dari tiga metode, yaitu metode standar tunggal, metode kurva kalibrasi, dan metode adisi standar. Metode standar tunggal adalah menggunakan satu larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya. Metode kurva kalibrasi dibuat seri larutan standar dengan berbagai konsentrasi dan absorbansi dari larutan tersebut diukur dengan SSA. Metode adisi Standar adalah metode yang banyak digunakan karena dapat meminimalisir kesalahan analisa.

SSA sendiri memiliki keunggulan dan kelemahannya masing-masing. Keunggulan dari SSA adalah spesifik batas deteksi yang rendah dari larutan yang sama dapat mengukur unsur-unsur yang berlainan pengukurannya langsung terhadap contoh output dapat langsung dibaca, cukup ekonomis, dapat diaplikasikan pada banyak jenis unsur batas kadar penentuan luas yaitu dari ppm hingga %. Sedangkan, kelemahan dari SSA sendiri adalah terdapat pengaruh kimia dimana SSA tidak mampu menguraikan zat menjadi atom misalnya pengaruh fosfat terhadap C, pengaruh ionisasi yaitu jika atom tereksitasi tidak hanya disosiasi sehingga menimbulkan emisi pada panjang gelombang yang sama pengaruh matriks, misalnya pelarut.

SEM-EDX

Scanning Electron Microscope (SEM) adalah jenis mikroskop elektron yang menghasilkan gambar sampel dengan memindai permukaan dengan sinar elektron yang terfokus dengan perbesaran hingga skala tertentu. Elektron berinteraksi

dengan atom dalam sampel, menghasilkan berbagai sinyal yang berisi informasi tentang topografi permukaan dan komposisi sampel.

Energy Dispersive X-Ray (EDX) digunakan untuk analisis elemental kimia bahan. Kemampuan karakterisasi sebagian besar disebabkan oleh prinsip dasar bahwa setiap elemen memiliki struktur atom yang unik yang memungkinkan serangkaian puncak unik pada spektrum emisi elektromagnetiknya (yang merupakan prinsip utama spektroskopi).

Scanning Electron Microscope (SEM) (S-3400N, Hitachi) yang dilengkapi dengan Electron Dispersive X-Ray Analyzer (EDX) dapat digunakan untuk memberikan analisis unsur sampel. Pemindaian Mikroskop Elektron adalah teknik yang kuat yang dapat digunakan untuk menyelidiki pengikatan ion logam pada suatu sampel. SEM memungkinkan evaluasi perubahan morfologi pada permukaan, misalnya perubahan komposisi dinding sel setelah ion logam meningkat. SEM yang dikombinasikan dengan EDX, dapat memberikan dukungan atau masukan yang berharga dalam menentukan distribusi elemen pada berbagai permukaan sampel. Harus ditekankan SEM hanya menyediakan estimasi kualitatif dari struktur permukaan.