

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kosmetik

Kata kosmetik diambil dari kata Yunani “kosmetikos” yang diartikan keterampilan menghias, mengatur (Latifah & Iswari, 2013). Dalam Peraturan BPOM Nomor 12 Tahun 2023 tentang Pengawasan Pembuatan dan Peredaran Kosmetik, definisi kosmetik yaitu sediaan atau bahan yang dapat dipakai pada bagian luar tubuh seperti epidermis, rambut, kuku, bibir dan lain sebagainya untuk membersihkan, membuat penampilan menarik, mengubah penampilan, memperbaiki bau badan dan melindungi tubuh agar dalam keadaan baik (BPOM RI, 2023). Sediaan kosmetik ini tidak digunakan untuk mengobati atau menyembuhkan suatu penyakit, dimana kosmetik tidak dapat mengubah struktur kulit dan faal kulit. Namun, jika kosmetik berasal dari bahan kimia, maka kosmetik tersebut dapat menyebabkan reaksi dan perubahan faal kulit (Latifah & Iswari, 2013).

Kosmetik dibedakan menjadi dua jenis berdasarkan manfaat untuk kulit dan pemakaiannya yaitu kosmetik untuk riasan wajah (*make-up*) dan kosmetik perawatan kulit wajah (*skin care*). Pada kosmetik riasan wajah digunakan untuk merias dan menutupi cacat pada kulit yang bersifat sementara. Untuk pemakaian dan pembersihannya dapat dilakukan secara instan. Contoh kosmetik riasan wajah ini seperti bedak, lipstik, pensil alis, perona mata, perona pipi, dan maskara. Kemudian pada kosmetik perawatan kulit (*skin care*), dibagi menjadi beberapa bagian yaitu kosmetik untuk membersihkan kulit (*cleanser*), kosmetik untuk melembabkan kulit (*moisturizer*), kosmetik untuk melindungi kulit (*sunscreen*), kosmetik untuk menipiskan kulit (*peeling*), dan krim kulit (Tranggono & Latifah, 2007). Krim kulit terdiri dari banyak jenis, salah satu krim kulit yang digunakan dalam kosmetik perawatan kulit wajah (*skin care*) yaitu krim pemutih.

2.2 Krim Pemutih

Pengertian krim menurut Farmakope Indonesia Edisi VI yaitu bentuk sediaan setengah padat mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai. Istilah ini secara tradisional telah digunakan untuk sediaan setengah padat yang mempunyai konsistensi relatif cair

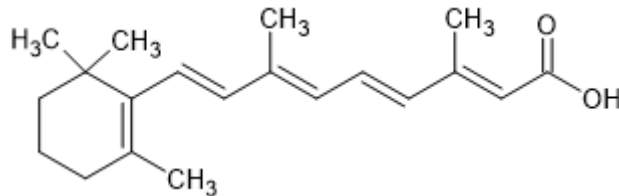
diformulasi sebagai emulsi air dalam minyak atau minyak dalam air. Pengertian lain dituliskan dalam Peraturan BPOM tahun 2019, bahwa krim adalah sediaan obat tradisional setengah padat mengandung satu atau lebih ekstrak terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar krim yang sesuai dan ditujukan untuk pemakaian topikal pada kulit. Dalam peraturan tersebut, krim dibagi menjadi bermacam-macam jenis. Contohnya seperti krim bayi, krim malam, krim siang, dan krim pemutih.

Menurut SNI 16-4954-1998 tentang Persyaratan Krim Pemutih Kulit, krim pemutih merupakan sediaan kosmetik yang berbentuk krim berupa campuran bahan kimia dan atau bahan lainnya yang digunakan untuk memucatkan noda hitam/coklat pada kulit. Pada krim pemutih, bahan-bahan pencerah yang biasa digunakan untuk zat aktif yaitu seperti asam kojat dan vitamin C, asam kojat yang berasal dari asam lemak minyak sawit ini berfungsi sebagai agen *depigmenting* yang tidak beracun dengan efek penghambatan pembentukan melanin dan mengurangi aktivitas tirosinase. Kemudian vitamin C yang dapat digunakan untuk pengobatan hiperpigmentasi (Haerani, 2017). Meski begitu, masih banyak ditemukan krim pemutih yang menggunakan bahan berbahaya yang dilarang penggunaannya di dalam kosmetik karena beresiko menimbulkan efek negatif bagi kesehatan menurut Peraturan BPOM Nomor 23 Tahun 2019 Tentang Persyaratan Teknis Bahan Kosmetika seperti merkuri, hidrokinon, dan asam retinoat (BPOM RI, 2019).

2.3 Asam Retinoat

Asam retinoat digolongkan dalam obat yang diberikan oleh dokter untuk penyakit kulit, dilansir dari artikel BPOM berjudul "Kosmetik", asam retinoat dapat digunakan sebagai zat aktif dalam produk pemutih karena dapat mengurangi pigmentasi dan penghambatan pembentukan pigmen serta dapat mempercepat pergantian epidermis. Meskipun demikian, asam retinoat memiliki beberapa efek samping pada kulit yaitu rasa kulit terbakar, perih, dan eritema (Arbab dkk., 2010). Efek samping lain dari asam retinoat yaitu dapat menyebabkan kerusakan ginjal (Ma dkk., 2023), cacat pada janin (Dewi, 2022), dan teratogenik (BPOM, 2011).

Menurut Farmakope Indonesia edisi VI Tahun 2020, asam retinoat mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 103,0% dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan. Sedangkan untuk krim asam retinoat mengandung asam retinoat tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 120,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Sifat fisika dan kimia asam retinoat sebagai berikut (Kementerian Kesehatan RI, 2020) :



Gambar 2. 1 Struktur Asam Retinoat

- 1) Rumus molekul : $C_{20}H_{28}O_2$
- 2) Berat molekul : 300,44 g/mol
- 3) Pemerian : Serbuk hablur, kuning sampai jingga muda
- 4) Kelarutan : Tidak larut dalam air, sukar larut dalam etanol dan dalam kloroform

Kandungan asam retinoat dalam krim pemutih dianalisis menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Namun sebelum itu, sampel krim pemutih dilakukan uji organoleptik dan uji warna (Nursidika dkk., 2018).

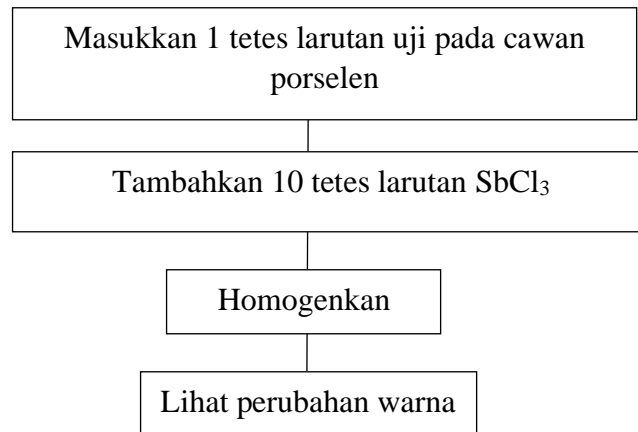
2.4 Uji Organoleptik

Pengujian dilakukan dengan mengambil sejumlah sampel krim pemutih kemudian diletakkan pada cawan porselen dan diamati secara visual dari warna, tekstur, dan bau dari sampel krim pemutih. Hasil uji organoleptik menunjukkan bahwa ciri-ciri krim yang mengandung asam retinoat yaitu krim berwarna kuning cerah hingga pucat, berbau asam dan menyengat dan memiliki tekstur lengket dan mengilat (Choiril & Maylita, 2019).

2.5 Uji Warna

Metode uji warna untuk mengidentifikasi asam retinoat pada krim pemutih digunakan pereaksi antimon (III) klorida ($SbCl_3$) 20% dalam kloroform. $SbCl_3$ merupakan pereaksi yang digunakan untuk mendeteksi vitamin A (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Dalam identifikasi asam retinoat, reaksi yang terjadi antara $SbCl_3$ dan asam retinoat ini akan menghasilkan larutan berwarna kompleks biru

(Kumar dkk., 2021). Untuk melakukan uji warna pada krim pemutih, dapat dilakukan seperti pada skema di bawah ini (Fahrunnisa, 2022) :



Gambar 2. 2 Skema Uji Warna

Dari uji organoleptik dan uji warna, analisis asam retinoat pada krim pemutih dilanjutkan dengan uji kualitatif menggunakan metode kromatografi yaitu kromatografi lapis tipis. Metode ini merupakan teknik pemisahan campuran senyawa dalam suatu sampel berdasarkan perbedaan interaksi sampel dengan fase diam dan fase gerak (Rubiyanto, 2017).

2.6 Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik pemisahan multi tahap dimana komponen suatu sampel didistribusikan antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam dapat berupa padatan atau cairan pendukung pada suatu padatan atau gel. Fase diam dapat dikemas dalam suatu kolom, menyebar dalam suatu lapisan, didistribusikan sebagai suatu film, atau diaplikasikan oleh teknik lain. Fase gerak dalam kromatografi dapat berupa gas atau cairan atau fluida superkritis (Kementeriaan Kesehatan RI, 2020). Fluida Superkritis merupakan zat yang dapat berdifusi melalui benda padat, seperti gas, dan melarutkan beda seperti cairan. Fluida superkritis memiliki kepadatan seperti cairan, viskositas seperti gas dan difusivitas diantara cairan dan gas (Sapkale dkk., 2010).

Berdasarkan sifat dari alat yang digunakan, metode kromatografi dibedakan menjadi dua jenis yaitu kromatografi modern dan konvensional. Kromatografi modern merupakan teknik pemisahan komponen zat suatu senyawa yang mempunyai berat molekul tinggi dengan menggunakan alat yang canggih.

Contohnya yaitu KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi), kromatografi gas dan spektrometer massa. Sedangkan yang dimaksud kromatografi konvensional merupakan teknik pemisahan dengan menggunakan alat yang sederhana, contohnya seperti kromatografi kertas, kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (Wulandari, 2011).

Menurut Peraturan BPOM Tahun 2011 tentang metode analisis kosmetika, asam retinoat dapat dianalisis menggunakan 2 (dua) jenis kromatografi yaitu Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). KLT merupakan metode pemisahan berdasarkan adsorpsi dan partisi, yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen) (Gandjar dan Rohman, 2009). Sedangkan KCKT merupakan pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi karena terdapat teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi dan detektor yang sensitif dan beragam (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Meski demikian, metode KLT juga memiliki kelebihan yaitu dapat mengidentifikasi pemisahan komponen dengan pereaksi warna, fluoresensi, dan menggunakan radiasi UV (Rochman, 2021). Karena asam retinoat memiliki cincin aromatik, ausokrom anion – OH, dan ikatan rangkap terkonjugasi sehingga dapat dianalisis dengan metode KLT dideteksi menggunakan detektor UV (Nasiti, 2016).

2.7 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) termasuk metode kromatografi sederhana dan banyak digunakan. Peralatan dan bahan yang diperlukan untuk pemisahan dan analisis menggunakan KLT sangat sederhana yaitu bejana tertutup (*chamber*) yang berisi pelarut dan lempeng KLT (Wulandari, 2011). Metode kromatografi menggunakan fase diam berupa padatan yang diaplikasikan berbentuk datar pada permukaan kaca atau aluminium sebagai penyangganya sedangkan fase gerak berupa zat cair (Rubiyanto, 2017).

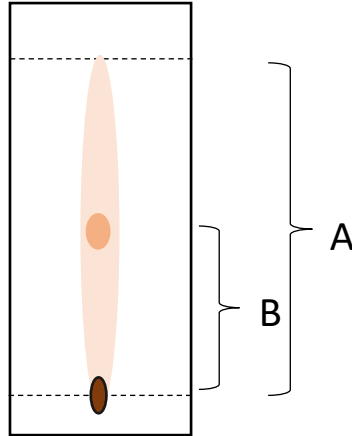
Kromatografi lapis tipis merupakan suatu metode pemisahan yang terjadi berdasarkan perbedaan kemampuan daya serap (adsorpsi) dan kemampuan partisi, serta kelarutan komponen-komponen kimia yang bergerak sesuai dengan polaritas eluen. Karena adsorben mempunyai kemampuan adsorpsi yang berbeda terhadap komponen kimia, maka komponen tersebut bergerak dengan kecepatan yang

berbeda, sehingga hal ini dapat menyebabkan terjadinya pemisahan (Nurdiani, 2018).

Prinsip metode KLT ialah analit bergerak ke atas atau melalui fase diam (umumnya silika gel) dibawah pengaruh fase gerak (biasanya campuran pelarut organik), yang melewati fase diam melalui aksi kapiler (Watson, 2013). Analisis menggunakan KLT dapat dimulai dengan menotolkan sebagian kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT) untuk membuat zona awal. Kemudian sampel dikeringkan, lalu dicelupkan ujung fase diam yang berisi zona awal ke dalam fase gerak (pelarut tunggal atau campuran dua hingga empat pelarut murni) di dalam bejana kromatografi. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, campuran komponen sampel akan berpindah dengan kecepatan berbeda ketika fase gerak melewati fase diam. Hal tersebut dinamakan pengembangan kromatogram. Ketika fase gerak telah menempuh jarak yang diinginkan, fase diam diambil dan lempeng yang sudah dilewati fase gerak tersebut kemudian dikeringkan. Noda yang dihasilkan diperiksa secara langsung (secara visual) atau di bawah sinar Ultraviolet (UV), dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang sesuai (Wulandari, 2011).

Pada analisis asam retinoat menggunakan metode kromatografi lapis tipis dapat menggunakan beberapa sistem larutan pengembang. Menurut Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan RI Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011 Tentang Metode Analisis Kosmetika, larutan pengembang dibagi menjadi tiga sistem. Pada sistem A yaitu campuran n-heksan dan asam asetat glasial 0,33% dalam etanol mutlak (9:1) v/v, sistem B menggunakan campuran n-heksan dan aseton (6:4) v/v, dan sistem C menggunakan campuran sikloheksan-eteraseton-asam asetat glasial (54:40:4:2) v/v/v/v (BPOM RI, 2011).

Dalam metode KLT, untuk menentukan jenis senyawa yang dianalisis dapat menggunakan nilai *R_f* (*Retardation faktor*), nilai *R_f* dinyatakan sebagai perbandingan jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik awal (jarak elusi sampel) terhadap jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik awal aplikasi (jarak pelarut) (Rubiyanto, 2017).



Gambar 2. 3 *Rf* pada lempeng KLT (a) jarak pelarut (b) jarak elusi sampel

Pada KLT, nilai *Rf* didefinisikan sebagai berikut :

$$\text{Nilai } Rf = \frac{\text{jarak elusi sampel}}{\text{jarak pelarut}}$$

Kisaran nilai *Rf* adalah antara 0 hingga 1, dan nilai *Rf* optimal adalah 0,2-0,8. Untuk deteksi UV adalah nilai *Rf* antara 0,2-0,8 dan deteksi cahaya tampak 0,2-0,9. Ketika *Rf* kurang dari 0,2 belum terjadi kesetimbangan antara komponen senyawa dan fasa diam dan fase gerak, sehingga bentuk noda biasanya kurang simetris. Sedangkan pada *Rf* diatas 0,8 noda analit akan diganggu oleh absorbansi pengotor lempeng fase diam yang teramati pada visualisasi dengan lampu UV. Sedangkan pada deteksi pada cahaya tampak, nilai *Rf* dapat lebih tinggi dari deteksi UV, hal ini disebabkan pengotor fase diam tidak bereaksi dengan penampak noda sehingga noda yang berada pada *Rf* 0,2 – 0,9 masih dapat diamati dengan baik (Wulandari, 2011).

Berdasarkan Peraturan BPOM RI Nomor HK.03.1.23.08.11.07331. Tahun 2011 Tentang Metode Analisis Kosmetika, untuk menentukan hasil positif atau negatif dari sampel, digunakan nilai *Rf*. Nilai *Rf* merupakan perbandingan jarak bercak larutan sampel dengan larutan baku. Hasil positif ditandai dengan nilai *Rf* sampel yang sama dengan nilai *Rf* baku serta kesamaan warna bercak sampel dan baku yang diamati dibawah sinar lampu UV 254 nm (BPOM RI, 2011). Berikut perkiraan nilai *Rf* baku asam retinoat menurut Peraturan BPOM RI Nomor HK.03.1.23.08.11.07331. Tahun 2011 Tentang Metode Analisis Kosmetika :

Tabel 2. 1 Identifikasi nilai *R_f* menurut BPOM

| Sistem pengembang | Perkiraan nilai <i>R_f</i> | Batas deteksi (μg) |
|--|--------------------------------------|---------------------------------|
| Sistem A: n-heksan-asam asetat glasial 0,33% dalam etanol mutlak (9:1) v/v | 0,1-0,3 | 0,125 |
| Sistem B : n-heksan-aseton (6:4) v/v | 0,5 | |
| Sistem C : sikloheksan-eter-aseton-asam asetat glasial (54:40:4:2) v/v/v/v | 0,4 | |

2.7.1 Fase Diam Kromatografi Lapis Tipis

Fase diam KLT berupa lapisan tipis, kering merata, terbuat dari bahan serbuk halus dilapiskan secara akurat pada suatu lempeng kaca, plastik, atau aluminium. Fase diam dari lempeng kromatografi lapis tipis mempunyai ukuran partikel rata-rata 10-15 μm (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan sepotong kaca, logam atau plastik kaku yang dilapisi lapisan tipis silika gel atau alumina. Silika gel merupakan fase diam yang sering digunakan dalam metode KLT dan mengandung zat yang berfluoresensi dalam sinar UV (Rosamah, 2019).

Berikut beberapa fase diam yang digunakan dalam KLT (Rubiyanto, 2017):

- Silika gel : asam-asam amino, asam-asam lemak, alkaloid, dan lain-lain.
Silika gel memiliki beberapa jenis :
 - Silika gel G : mengandung 13% CaSO_4 sebagai bahan perekat.
 - Silika gel H : tanpa kandungan CaSO_4 .
 - Silika gel PF : mengandung bahan fluoresensi.
- Alumina : fenol-fenol, zat warna, alkaloid dan lain-lain.
- Kielsghur (tanah diatome) : gula, oligosakarida, trigliserida, dan lain-lain.
- Selulosa : asam-asam amino, alkaloid, dan lain-lain.

2.7.2 Fase Gerak Kromatografi Lapis Tipis

Dalam KLT, fase gerak memiliki peran untuk memindahkan *solute* dari adsorben sehingga *solute* dapat dibawa dalam fase gerak melewati plat/lempengan. Selain itu juga membantu untuk memisahkan suatu campuran *solute* (sampel), sehingga fase gerak dapat disimpan pada tempat yang berbeda

dan dapat diidentifikasi. Dalam fase gerak, sistem yang paling sederhana ialah campuran antara dua pelarut organik karena daya elusi campuran dapat diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat optimal. Berikut adalah petunjuk yang digunakan untuk melakukan optimasi fase gerak (Gandjar & Rohman, 2007) :

- Memiliki kemurnian yang sangat tinggi.
- Daya elusi harus diatur sedemikian rupa agar nilai R_f terletak di antara 0,2- 0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
- Polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solut, yang juga akan menentukan nilai R_f .

2.7.3 Prosedur KLT

Tahapan metode analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ini yaitu dilakukan dengan beberapa persiapan yang harus dipenuhi untuk mendapatkan hasil pemisahan sampel yang baik. Berikut tahapan analisis menggunakan metode KLT meliputi :

2.7.3.1 Preparasi Sampel

Dalam analisis sampel retinoat pada sediaan krim pemutih digolongkan dalam sampel semi padat. Preparasi sampel semi padat dilakukan dengan cara penghancuran sampel dengan cara digerus atau diblender. Sampel yang telah dihancurkan diekstraksi dengan pelarut yang dapat melarutkan analit dengan cara manual (dikocok) atau menggunakan alat dengan menggunakan *vortex mixer* atau *ultrasonic degaser*. Kesempurnaan penarikan analit dengan cara ekstraksi juga harus dipastikan. Ekstraksi pada sampel semi padat dapat dibantu dengan pemanasan. Pemanasan dapat mengencerkan bentuk sampel dari semi padat menjadi larutan sehingga penarikan analit dalam sampel menjadi lebih mudah. Hanya saja pada pemisahan ampas dengan larutan pengekstrak sebaiknya dilakukan sebelum dingin karena bila pemisahan dilakukan setelah sampel dingin dikawatirkan analit akan terjebak kembali ke dalam sampel semi padat (Wulandari, 2011).

2.7.3.2 Preparasi Lempeng KLT

Preparasi lempeng KLT dilakukan dengan pemotongan lempeng dengan pendukung aluminium foil menggunakan gunting. Saat pemotongan lempeng dengan pendukung aluminium foil sudut gunting harus diperhatikan. Sudut

gunting tidak boleh cenderung ke kiri. Karena hal ini biasanya menyebabkan lepasnya sorben dari pendukungnya. Akibatnya, terjadi kesenjangan kapilaritas antara sisi lapisan sorben tepi dengan sisi lapisan sorben tengah, di mana pelarut bergerak maju lebih cepat pada sisi tepi dibandingkan sisi tengah dari kromatogram tersebut. selanjutnya lempeng dilakukan pencucian untuk menghilangkan pengotor lempeng baik itu pengotor yang berasal dari bahan pengikat lempeng maupun dari atmosfer yang teradsorpsi ke dalam lempeng. Pencucian lempeng KLT dilakukan dengan cara mengelusi lempeng dengan metanol, campuran metanol dengan kloroform atau dengan eluen yang digunakan. Setelah dielus, lempeng harus dikeringkan untuk menghilangkan eluen yang terjebak dalam lempeng sehingga tidak ada pelarut. Setelah kering lempeng hasil pencucian dapat digunakan untuk analisis. Selanjutnya untuk preparasi lempeng KLT dapat dilakukan aktivasi lempeng KLT. Aktivasi ini bertujuan untuk menghilangkan kelembaban air atmosfer yang teradsorpsi dalam lempeng KLT. Untuk lempeng silika gel dan aluminium oksida proses pengaktifan dilakukan dengan pengeringan lempeng silika gel 30 menit pada suhu 120°C. Suhu yang digunakan tidak terlalu tinggi agar tidak menyebabkan pelepasan senyawa kimia dalam lempeng yang dapat merubah sifat silika gel secara *irreversible* (tak terpulihkan). Pada kromatografi adsorpsi, aktivitas lempeng yang tinggi akan meningkatkan ketertambatan fase diam sehingga jarak migrasi sampel akan menjadi lebih pendek (Wulandari, 2011).

2.7.3.3 Preparasi Fase Gerak

Fase Gerak yang digunakan dalam analisis KLT harus memenuhi persyaratan sebagai berikut :

- Memiliki kemurnian yang cukup.
- Stabil.
- Memiliki viskositas rendah.
- Memiliki partisis isothermal yang linier.
- Tekanan uap yang tidak terlalu rendah atau tinggi.
- Memiliki toksisitas rendah.

Pemilihan fase gerak yang tepat dapat dilakukan melalui tahapan optimasi eluen. Optimasi eluen dimulai dengan menentukan karakteristik fisika kimia analit yang akan dianalisis dan jenis sorben fase diam yang digunakan (Wulandari, 2011).

2.7.3.4 Penanganan Bejana KLT

Dalam penanganan bejana KLT, penting untuk memperhatikan kondisi bejana KLT dan jenis bejana yang digunakan. Dimana bejana KLT harus bersih (tidak ada kotoran) dan kering (tidak ada air). Adanya kotoran dan air pada bejana KLT dapat mengganggu kromatogram yang dihasilkan dan mempengaruhi kemampuan reproduksi pemisahan KLT. Jenis bejana KLT yang digunakan harus dipertimbangkan untuk menentukan teknik pengembangan yang akan digunakan. Berikut ini adalah beberapa jenis bejana KLT (Wulandari, 2011) :

- bejana Nu (bejana normal, alas datar, tak jenuh).
- bejana Ns (bejana normal, alas datar, jenuh).
- bejana *Twin-trough* (bejana dengan dua kompartemen tempat eluen).
- bejana Su (bejana *sandwich*, tak jenuh).
- bejana Ss (bejana *sandwich*, jenuh).
- bejana horizontal (jenuh dan tak jenuh).
- bejana elusi otomatis.

Penggunaan bejana pada proses analisis menggunakan KLT, perlu diperhatikan kejenuhannya. Proses penjenuhan bejana KLT ini penting untuk mengendalikan proses pemisahan yang rentan terhadap perubahan kelembaban. Dalam pembentukan suasana jenuh, fase gerak dituangkan kedalam bejana lalu dinding bejana diberi kertas saring atau pelapis saturasi. Bejana ditutup hingga kertas saring terbasahi sempurna oleh fase gerak yang menunjukkan bahwa telah terjadi kesetimbangan uap (Kaczmariski dkk., 2003).

2.7.3.5 Penotolan Sampel

Dalam menotolkan sampel pada sorben lempeng KLT dapat dilakukan secara manual dengan peralatan sederhana, semi otomatis dan dapat dengan peralatan otomatis. Untuk menotolkan sampel secara manual, sebelum sampel ditotolkan pada lempeng, posisi awal penotolan diberi tanda berupa titik dengan pensil dan akhir elusi ditandai berupa garis. Sedapat mungkin penandaan tidak merusak sorben KLT. Alat yang digunakan dalam menotolkan sampel secara

manual yang paling banyak digunakan adalah pipet mikro kapiler (*microcaps*). Caranya dengan mencelupkan pipet kapiler mikro, larutan secara otomatis akan mengisi ruang dalam pipet mikro kapiler. Setelah terisi, pipet dapat ditempelkan pada permukaan lempeng. Setelah itu larutan sampel akan berpindah dari pipet kapiler menuju sorben lempeng. Sedangkan untuk penotolan semi otomatis, dalam hal ini sampel dapat ditotolkan pada lapisan permukaan lempeng tepat sesuai dengan yang diinginkan, menggunakan dosis kecil dan tidak merusak lapisan lempeng. Sebagai contoh alat untuk aplikasi penotolan dengan volume yang konstan lempeng KLT adalah Nanomat 4 dengan pemegang kapiler. Kemudian untuk sistem yang sepenuhnya otomatis, mempunyai program yang dapat menyimpan kondisi elusi dalam komputer. Aplikasi noda dan pita dapat diprogram, dengan nomor aplikasi dan posisi ukuran yang detail (Wulandari, 2011).

2.7.3.6 Pengembangan Lempeng KLT

Terdapat beberapa jenis metode pengembangan lempeng KLT, diantaranya yaitu :

1. Metode pengembangan satu dimensi

Pada metode ini terdapat banyak jenis pengembangan, salah satu pengembangan satu dimensi yang banyak digunakan untuk mendapatkan kromatogram KLT yang bagus ialah metode pengembangan linier. Metode pengembangan ini dibedakan menjadi dua jenis yaitu pengembangan menaik (*ascending*) dan pengembangan menurun (*descending*). Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan eluen dalam bejana KLT, setelah bejana KLT jenuh, lempeng bagian bawah direndam kedalam eluen dalam bejana KLT. Pada metode pengembangan menaik (*ascending*), eluen akan berpindah dari bawah lempeng menuju keatas dengan gaya kapilaritas sedangkan pada pengembangan menurun (*descending*) eluen akan bergerak dari atas ke bawah (Wulandari, 2011).

2. Metode Pengembangan Dua Dimensi

Pengembangan dua dimensi digunakan untuk mengidentifikasi senyawa dalam sampel yang memiliki banyak komponen. Metode ini bertujuan untuk meningkatkan resolusi (pemisahan) sampel ketika komponen-komponen *solute* mempunyai sifat kimia yang hampir serupa. Pengembangan ini dilakukan dengan

cara lempeng dielusi dengan eluen pertama, kemudian dikeringkan dan dielusi kembali dengan eluen kedua dengan arah perpindahan eluen yang berbeda. Eluen kedua dapat sama ataupun berbeda dari eluen sebelumnya (Wulandari, 2011).

2.7.3.7 Evaluasi Noda

Evaluasi noda dapat dilakukan dengan atau tanpa bantuan instrumen yang lain. Untuk noda yang berwarna dapat diamati secara langsung sedangkan untuk noda yang tidak berwarna diperlukan beberapa jenis visualiasi dari zona kromatografi. Untuk noda yang tidak berwarna tidak muncul di cahaya normal tetapi dapat menyerap radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang lebih pendek. Hal ini sering terdeteksi dalam rentang UV, biasanya di panjang gelombang 200-400 nm. Zona kromatografi biasanya muncul dengan latar belakang gelap atau cahaya atau jika fluoresensi terjadi. Selain dengan pengamatan dibawah sinar UV, visualisasi dapat dilakukan dengan cara menyemprotkan atau mencelupkan reaksi penampak noda pada lempeng KLT. Hal ini dapat dilakukan karena pada umumnya sorben yang digunakan pada lempeng bersifat *inert* maka reaksi kimia dapat dilakukan di atas lempeng tanpa terpengaruh lapisan sorben. (Wulandari, 2011).

2.7.4 Kelebihan dan Kekurangan KLT

Kelebihan dari metode Kromatografi Lapis Tipis antara lain (Gandjar & Rohman, 2007) :

1. Menggunakan alat yang sederhana dan prosesnya cepat.
2. Digunakan untuk tujuan analisis.
3. Dapat menggunakan pereaksi warna, fluoresensi, atau radiasi menggunakan sinar UV untuk identifikasi pemisahan komponen.
4. Dapat menggunakan elusi menaik (*ascending*) dan menurun (*descending*) atau dengan elusi dua dimensi.
5. Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak.

Adapun kekurangan dari metode Kromatografi Lapis Tipis antara lain (Spangenberg dkk., 2011) :

1. Efisiensi pemisahan yang lebih sedikit.
2. Reprodusibilitas nilai R_f bergantung pada kondisi lingkungan.