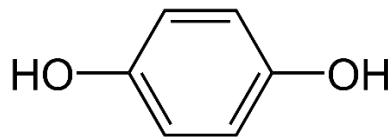


BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hidrokuinon

Hidrokuinon atau p-dihidroksibenzen memiliki nama IUPAC yaitu 1,4-benzenediol atau quinol, yang memiliki rumus molekul $C_6H_6O_2$ dengan berat molekul 110,1 g/mol. Pemerian berbentuk jarum halus, putih, mudah menjadi gelap jika terpapar cahaya dan udara. Hidrokuinon mudah larut dalam air, etanol dan eter (FI V, 2014). Hidrokuinon merupakan salah satu senyawa golongan fenol. Fenol merupakan senyawa yang mudah dioksidasi. Fenol yang dibiarkan di udara terbuka cepat berubah warna karena pembentukan hasil-hasil oksidasi. Hidrokuinon (1,4-dihidroksibenzena), reaksinya mudah dikendalikan dan menghasilkan 1,4-benzokuinon sering dinamakan kuinon (Hart, 1983).



Gambar 2. 1 Struktur Hidrokuinon

Hidrokuinon termasuk golongan obat keras yang hanya dapat digunakan berdasarkan resep dokter (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2009). Senyawa ini mengalami oksidasi terhadap cahaya dan udara dan digunakan sebagai bahan pemutih dan pencegahan pigmentasi yang bekerja menghambat enzim tirosinase yang berperan dalam penggelapan kulit (Mansur, 2015). Hidrokuinon dalam kosmetik mampu mengelupas kulit bagian luar dan menghambat pembentukan melanin yang membuat kulit tampak hitam. Penggunaan krim hidrokuinon dibawah 1% dalam produk pencerah kulit untuk mengontrol hiperpigmentasi telah dianggap aman dan efektif. Hidrokuinon dengan kandungan diatas 2% dikategorikan sebagai bahan berbahaya bagi kesehatan dan bersifat toksik bagi tubuh (Rubiyati & Setiawan, 2018).

Hidrokinon banyak digunakan pada produk kosmetik karena sifatnya sebagai antioksidan dan sebagai depigmenting agent (zat yang mengurangi warna gelap pada kulit). Cara kerja hidrokinon dalam mencerahkan kulit adalah melalui mekanisme efek toksik hidrokinon terhadap melanosit (sel tempat sintesis melanin/pigmen hitam pada kulit) dan melalui penghambatan melanogenesis (proses pembentukan melanin). Efek toksik hidrokinon terjadi karena hidrokinon berkompetisi dengan tirosin sebagai substrat untuk tirosinase (enzim yang berperan dalam pembentukan melanin), sehingga tirosinase mengoksidasi hidrokinon dan menghasilkan benzokuinon yang toksik terhadap melanosit (Rahmi S, 2017).

Menurut Dr. Retno Iswari Tranggono, Sp.KK, ahli kulit sekaligus ketua Himpunan Ilmuan Kosmetika Indonesia (HIKI) penggunaan Hidrokuinon dalam kosmetika dapat merusak kulit. Saat pertama menggunakan krim pemutih, hasilnya memang memuaskan. Kulitnya yang semula agak gelap berubah menjadi terang. Namun, lama-kelamaan kulitnya terasa panas dan memerah. Pemakaian Hidrokuinon dalam kosmetik dapat membuat kulit malah kusam dan timbul bercak-bercak hitam, ini karena tidak semua melanosit hancur oleh Hidrokuinon. Sisa-sisa melanosit yang tidak hancur akan membentuk pertahanan hingga kebal terhadap Hidrokuinon.

Hidrokuinon memiliki efek yang berbahaya atau beracun jika digunakan sebagai salah satu bahan aktif utama dalam krim pemutih kulit. Efek terhadap kesehatan seperti neuropati, ochronosis eksogen, dan leukoderma dengan depigmentasi mirip confetti setelah paparan jangka panjang (Kooyers, T.J., 2004).

2.2. Krim Wajah

Krim adalah bentuk sediaan setengah padat mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai (DepKes RI, 2014). Krim umumnya kurang kental dan lebih ringan daripada salep sehingga mudah menyebar rata. Krim merupakan emulsi minyak dalam air, sehingga akan lebih mudah dibersihkan daripada sebagian besar salep. Krim dianggap mempunyai daya tarik estetik lebih besar karena sifatnya yang tidak berminyak dan kemampuannya berpenetrasi dengan cepat dalam kulit (Ansel, 1989).

Kualitas dasar krim, yaitu (Anief, 1994):

- Stabil, selama masih dipakai mengobati. Maka krim harus bebas dari inkompatibilitas, stabil pada suhu kamar, dan kelembaban yang ada dalam kamar.
- Lunak, yaitu semua zat dalam keadaan halus dan seluruh produk menjadi lunak dan homogen.
- Mudah dipakai, umumnya krim tipe emulsi adalah yang paling mudah dipakai dan dihilangkan dari kulit.
- Terdistribusi merata, obat harus terdispersi merata melalui dasar krim padat atau cair pada penggunaan.

2.2.1. Penggolongan Krim

Ada dua tipe krim, yaitu:

- a) Tipe A/M, yaitu air terdispersi dalam minyak. Contohnya, cold cream. Cold cream adalah sediaan kosmetik yang digunakan untuk memberikan rasa dingin dan nyaman pada kulit,

sebagai krim pembersih, berwarna putih, dan bebas dari butiran. Cold cream mengandung mineral oil dalam jumlah besar.

- b) Tipe M/A, yaitu minyak terdispersi dalam air. Contohnya, vanishing cream. Vanishing cream adalah sediaan kosmetik yang digunakan untuk membersihkan, melembabkan, dan sebagai alas bedak. Vanishing cream sebagai pelembab (moisturizing) akan meninggalkan lapisan berminyak/ film pada kulit.

2.2.2. Bahan Pembentuk Krim

- Minyak

Bahan ini digunakan untuk membentuk fase minyak dari emulsi. Minyak tersebut secara luas digunakan sebagai pembawa bahan obat. Minyak yang digunakan untuk pemberian rute oral pun dapat digunakan sebagai fase minyak, misalnya minyak biji jarak, minyak ikan maupun minyak nabati.

- Air

Bahan ini digunakan untuk membentuk fase air dari emulsi. Bahan yang sering digunakan seperti air dan alkohol.

- Bahan Pengemulsi atau Emulgator

Untuk membuat krim digunakan zat pengemulsi, umumnya berupa surfaktan-surfaktan anionik, kationik, atau nonionik.

- Untuk krim tipe air minyak (A/M) digunakan: Sabun polivalen, span, adeps lanae, kolesterol, cera
- Untuk krim tipe minyak air (M/A) digunakan:
 - Sabun Monovalen: Trietanolaminum Stearat, Natrium Stearat, Kalium Stearat, Ammonium Stearat
 - Tween
 - Natrium Lauril sulfat
 - Kuning telur, Gelatinum, kaseium
 - CMC
 - Pectinum
 - Emulgidum

Ada beberapa tipe krim seperti emulsi air dalam minyak dan emulsi minyak dalam air. Bahan pengemulsi krim harus disesuaikan dengan jenis dan sifat krim yang dikehendaki (Syamsuni, 2005). Untuk penstabilan krim ditambahkan zat antioksidan dan zat pengawet (Anief, 2002).

- Pengawet

Bahan pengawet sering digunakan umumnya adalah metilparaben (nipagin 0.12-0.18%), dan propilparaben (nipasol 0.02-0.05%) (Syamsuni, 2005).

2.2.3. Bahan Aktif Pencerah Kulit Berbahaya

Bahan pencerah kulit adalah setiap bahan atau kombinasi bahan yang dapat mengganggu suatu langkah dari jalur melanogenesis, transfer melanin, atau deskuamasi yang menghasilkan penurunan pigmentasi pada permukaan kulit baik berasal dari sumber alami dan sintetis. Namun, bahan aktif ini ada pula yang memiliki efek membahayakan kesehatan. Olumide, dkk, 2008 melaporkan bahwa merkuri, hidrokuinon, dan kortikosteroid adalah bahan aktif utama dalam kosmetik pemutih kulit yang digunakan di Afrika. Padahal bahan tersebut berbahaya bagi kesehatan apalagi jika digunakan dalam jangka waktu yang lama. Berbagai negara telah menetapkan peraturan khusus terkait penggunaan bahan pencerah kulit yang berbahaya dalam sediaan kosmetika. Di Indonesia, berdasarkan peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia nomor 17 tahun 2014 tentang perubahan atas peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan nomor hk.03.1.23.07.11.6662 tahun 2011 tentang Persyaratan Cemarkan Mikroba dan Logam Berat dalam Kosmetika di Pasal 4 disebutkan: (1) Cemarkan Logam berat sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (2) merupakan sesepora (trace element) yang tidak bisa dihindarkan.

Dalam krim pencerah kulit ditambahkan bahan aktif yang dapat berfungsi mencerahkan kulit. Namun sayangnya, dari bahan yang ditambahkan tersebut, seringkali ditambahkan bahan pencerah yang berbahaya bagi kesehatan, antara lain:

- Hidrokuinon

Hidrokuinon memiliki efek yang berbahaya atau beracun jika digunakan sebagai salah satu bahan aktif utama dalam krim pemutih kulit. Efek terhadap kesehatan seperti neuropati, ochronosis eksogen, dan leukoderma dengan depigmentasi mirip confetti setelah paparan jangka panjang (Kooyers, T.J., 2004). Meski begitu, masih banyak produk kosmetik yang masih mengandung hidrokuinon. Hal ini disebutkan pada penelitian sebelumnya oleh Irnawati dkk (2016) dari sampel krim pemutih wajah yang ada di salon kecantikan Kota Kendari, berdasarkan 5 sampel krim pemutih wajah yang beredar di salon kecantikan Kota Kendari diketahui terdapat 2 sampel yang positif mengandung hidrokuinon, kemudian pada penelitian Rahma Yulia dkk (2020) yang meneliti 5 sediaan krim malam dan dihasilkan semua krim positif mengandung hidrokuinon, kemudian pada penelitian Annisa Primadhamanti dkk (2019) yang meneliti 4 krim pemutih herbal yang dijual di lorong king pasar tengah kota bandar

lampung diketahui 2 sampel positif mengandung hidrokuinon, kemudian pada penelitian Arifiyana dkk (2019) yang meneliti 12 krim Pemutih yang Beredar di Wilayah Surabaya Pusat dan Surabaya Utara diketahui semua sampel positif mengandung hidrokuinon, kemudian pada penelitian Ari Sumarmini dkk (2019) yang meneliti 8 krim Pemutih yang Beredar di Jayapura diketahui 6 sampel positif mengandung hidrokuinon.

- Merkuri
- Kortikosteroid
- Titanium dioksida
- Antimony (Sb)
- Arsenik (As)
- Cadmium (Cd)
- Chromium (Cr)

2.3. Kromatografi lapis tipis

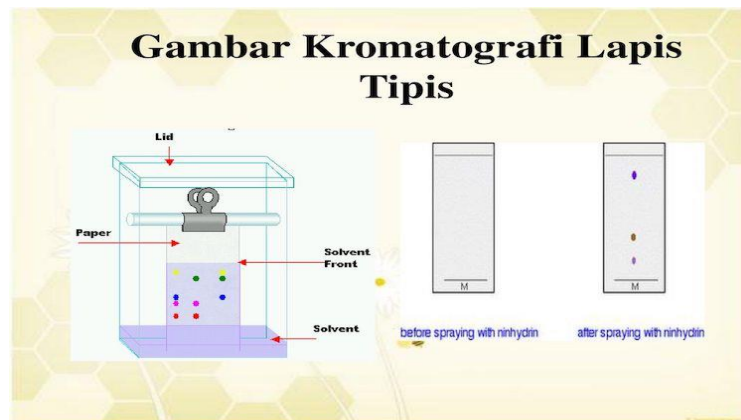
Kromatografi merupakan teknik pemisahan yang paling umum dan paling sering digunakan dalam bidang kimia analisis dan dapat dimanfaatkan untuk melakukan analisis, baik analisis kualitatif, kuantitatif, atau preparatif dalam bidang farmasi, lingkungan industri, dan sebagainya. Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara 2 fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Berdasarkan pada alat yang digunakan, kromatografi dapat dibagi atas:

- Kromatografi Planar
 - Kromatografi kertas
 - Kromatografi lapis tipis
- Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)
- Kromatografi Gas (KG)

Kromatografi Lapis Tipis merupakan salah satu metode isolasi yang terjadi berdasarkan perbedaan daya serap (adsorpsi) dan daya partisi serta kelarutan dari komponen-komponen kimia yang akan bergerak mengikuti kepolaran eluen (Suryadarma, 2014). Prinsip dari pemisahan kromatografi lapis tipis adalah adanya perbedaan sifat fisik dan kimia dari senyawa yaitu kecenderungan dari molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul untuk menguap dan kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan (adsorpsi, penjerapan) (Hendayana, 2006).

Pelaksanaan analisis dengan KLT diawali dengan menotolkan alikuot kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT), untuk membentuk zona awal. Kemudian sampel dikeringkan. Ujung fase diam yang terdapat zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal ataupun campuran dua sampai empat pelarut murni) di dalam chamber. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, campuran komponen-komponen sampel bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam. Hal ini disebut dengan pengembangan kromatogram. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan, fase diam diambil, fase gerak yang terjebak dalam lempeng dikeringkan, dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung (visual) atau di bawah sinar ultraviolet (UV) baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang cocok.

Perbedaan migrasi merupakan hasil dari perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen dalam fase diam dan fase gerak. Berbagai mekanisme pemisahan terlibat dalam penentuan kecepatan migrasi. Kecepatan migrasi komponen sampel tergantung pada sifat fisika kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel. Retensi dan selektivitas kromatografi juga ditentukan oleh interaksi antara fase diam, fase gerak dan komponen sampel yang berupa ikatan hidrogen, pasangan elektron donor atau pasangan elektron-akseptor (transfer charge), ikatan ionion, ikatan ion-dipol, dan ikatan van der Waals (Lestyo, 2011).



Gambar 2. 2 Prinsip Kromatografi Lapis Tipis

2.3.1. Metode Pemisahan

Metode pemisahan pada kromatografi terbagi menjadi:

- Pemisahan berdasarkan polaritas

Metode pemisahan berdasarkan polaritas, senyawa-senyawa terpisah karena perbedaan polaritas. Afinitas analit terhadap fase diam dan fase gerak tergantung kedekatan polaritas analit terhadap fase diam dan fase gerak (like dissolve like). Analit akan cenderung larut dalam fase dengan polaritas sama. Analit akan berpartisipasi diantara dua fase yaitu fase padat-cair dan fase

cair-cair. Ketika analit berpartisi antara fase padat dan cair faktor utama pemisahan adalah adsorpsi. Sedangkan bila analit berpartisi antara fase cair dan fase cair, faktor utama pemisahan adalah kelarutan. Prinsip pemisahan dimana analit terpisah karena afinitas terhadap fase padat dan fase cair biasa disebut dengan adsorpsi dan metode kromatografinya biasa disebut kromatografi adsorpsi. Sedangkan prinsip pemisahan dimana analit terpisah karena afinitas terhadap fase cair dan fase cair disebut dengan partisi dan metode kromatografinya biasa disebut kromatografi cair.

- Pemisahan berdasarkan muatan ion
- Pemisahan berdasarkan ukuran molekul
- Pemisahan berdasarkan bentukan spesifik (Lesty, 2011).

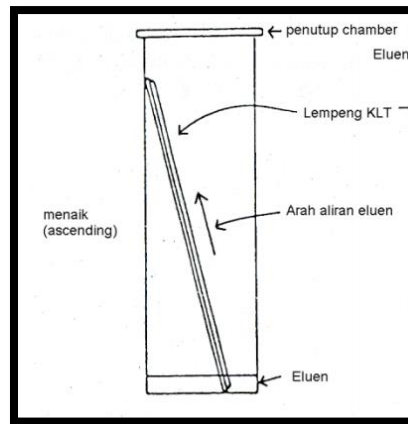
2.3.2. Metode Elusi

Metode pengembangan yang dipilih tergantung tujuan analisis yang ingin dicapai dan ketersediaan alat di laboratorium. Terdapat beberapa jenis metode pengembangan KLT :

- Metode pengembangan satu dimensi
 - Pengembangan non linier (melingkar)
 - Pengembangan linier
 - ✓ Pengembangan menaik (ascending)

Metode pengembangan linier yang paling sering digunakan adalah metode pengembangan menaik (ascending). Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan eluen dalam chamber, setelah chamber jenuh, ujung lempeng bagian bawah direndam ke dalam eluen dalam chamber. Eluen bermigrasi dari bawah lempeng menuju keatas dengan gaya kapilaritas. Beberapa hal yang perlu diperhatikan:

- Selama pengembangan, chamber harus berada diatas bidang yang datar, permukaan chamber juga harus sejajar (tidak miring), dan pastikan selama pengembangan tidak terganggu oleh hal-hal yang tidak diinginkan
- Selama pengembangan, dalam keadaan apapun tidak diperkenankan menggerakkan chamber untuk mengamati proses pengembangan
- Selama pengembangan juga tidak diperkenankan membuka tutup chamber untuk melihat garis depan eluen



Gambar 2. 3 Pengembangan ascending

- ✓ Pengembangan menurun (descending)
 - Pengembangan ganda
 - Pengembangan horizontal
 - Pengembangan kontinyu
 - Pengembangan gradien
- Pengembangan dua dimensi (Lesty, 2011).

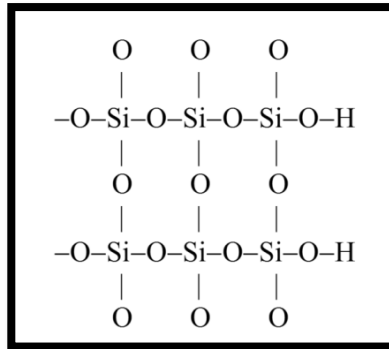
2.3.3. Fasa Diam dan Fasa Gerak untuk Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a) Fasa Diam

Fasa diam yang digunakan dalam Kromatografi Lapis Tipis adalah bahan penyerap (“adsorbent”). Dua sifat penting yang harus diperhatikan untuk Kromatografi Lapis Tipis adalah besar/kecilnya (ukuran) serta homogenitasnya, sebab daya lekat pada pendukung sangat ditentukan oleh kedua sifat tersebut. Partikel yang kasar tidak dapat memberikan pemisahan yang baik dan untuk memperbaikinya dapat digunakan butiran yang halus. Besar partikel yang biasa digunakan adalah 1 – 25 mikron. Partikel yang kecil dan halus dapat mempercepat aliran pelarut. Beberapa macam fase diam yang digunakan dalam Kromatografi Lapis Tipis :

- Silika gel

Silika gel biasa disebut asam silisik dan kieselgel, merupakan material putih amorf dan berporus. Umumnya dibuat dengan pengendapan larutan silikat dengan penambahan asam. Silika merupakan bahan yang berpori tinggi, merupakan silikon dioksida, tiap atom silikon dikelilingi empat atom oksigen, bentuk tetrahedron. Pada permukaan silika gel, pasangan elektron bebas dari atom oksigen berikatan dengan hydrogen. Cara pengendapan dan kondisi pengerjaan akan menggambarkan sifat khusus dari sebuah silika. Kondisi pembuatan mempengaruhi silika gel yang dihasilkan baik itu permukaan yang spesifik, volume pori yang spesifik, diameter rata-rata pori yang seragam dan lain-lain.



Gambar 2. 4 Struktur Silika Gel

- Alumina
- Selulosa
- Sephadex
- Kiesulguhr (Diatomaceus earth)
- Magnesium silikat (Dian dan Murwaniati, 2018).

b) Fasa Gerak

Pemilihan eluen merupakan faktor yang paling berpengaruh pada sistem KLT. Eluen dapat terdiri dari satu pelarut atau campuran dua sampai enam pelarut. Campuran pelarut harus saling sampurnya dan tidak ada tanda-tanda kekeruhan. Fungsi eluen dalam KLT:

- Untuk melarutkan campuran zat
- Untuk mengangkat atau membawa komponen yang akan dipisahkan melewati sorben fase diam sehingga noda memiliki Rf dalam rentang yang dipersyaratkan
- Untuk memberikan selektivitas yang memadai untuk campuran senyawa yang akan dipisahkan.

Eluen juga harus memenuhi persyaratan sebagai berikut: memiliki kemurnian yang cukup, stabil, memiliki viskositas rendah, memiliki partisi isothermal yang linier, tekanan uap yang tidak terlalu rendah atau tidak terlalu tinggi, toksisitas serendah mungkin.

Pemilihan eluen yang cocok dapat dilakukan melalui tahapan optimasi eluen. Pencarian eluen berdasarkan pustaka yang ada juga dapat membantu tahapan optimasi eluen. Eluen dari pustaka dapat dimodifikasi untuk mendapatkan pemisahan yang efisien. Bila noda yang dihasilkan belum bagus (noda masih berekor atau belum simetris), eluen dapat dimodifikasi dengan menambahkan sedikit asam atau basa sehingga merubah pH eluen. Dari beberapa eluen yang dicoba dalam optimasi eluen dapat ditentukan efisiensi kromatogram yang dihasilkan sehingga dapat diperoleh eluen yang optimal. Fase gerak yang digunakan umumnya adalah

pelarut organik yang memiliki tingkat kepolaran tinggi, misal khloroform, benzen, aseton, n-heksan, metanol, etanol dan air (Lesty, 2011).

- Kloroform

Sifat Fisis

Rumus molekul	: CHCl_3
Berat molekul	: 119,39 g/gmol
Wujud	: cairan bening
Kepolaran	: nonpolar
Titik didih	: 61,2oC
Titik leleh	: - 63,5oC
Densitas	: 1,48 gr/cm ³
Suhu kritis	: 264 oC
Specific gravity	: 1,489
Viskositas	: 0,57 cp (20oC)
Kapasitas panas	: 0,234 kal/g.oC , pada 20oC
Tekanan kritis	: 53,8 atm
Suhu kritis	: 263oC

Kelarutan dalam 100 mL air : 0,8 g (20oC) (Ketta & Cunningham., 1992)

- Methanol

Metanol (methyl alcohol) dengan rumus molekul CH_3OH adalah zat kimia yang tidak berwarna, berbentuk cair pada suhu kamar, mudah menguap dan sedikit berbau ringan. Metanol merupakan zat kimia yang toksin (beracun) dan menyebabkan efek berbahaya bila dihirup atau tertelan. Secara sintesis metanol dibuat dari hidrogen dan karbon dioksida.

Sifat fisika:

Kepolaran	: polar
Titik beku	: -97,8°C
Titik didih (pada 760 mmHg)	: 64,7°C
Densitas (pada 760 mmHg)	: 0,782 g/mL
Indeks bias, pada 20°C	: 1,3287
Viskositas, pada 30°C	: 0,5142 cP
Suhu kritik	: 240°C
Tekanan kritik	: 78,5 atm
Panas spesifik, liquid (pada suhu 25-30°C)	: 0,605-0,609 kal/g
Panas spesifik uap (pada suhu 100-200°C)	: 12,2-14,04 kal/g.mol

Panas penguapan (pada suhu 64,7°C) : 8430 kal/mol
Flash point, °C : 16:11 (wadah terbuka: wadah tertutup)
Kelarutan dalam air : miscible (Othmer, 1998)

▪ Toluena

Sifat fisika

Rumus molekul : $C_6H_5CH_3$ (C_7H_8)
Berat molekul : 92,141 g/mol
Bentuk : cair
Kepolaran : nonpolar
Titik didih : 110,63°C
Titik beku : -94,97 °C
Densitas : 0,8665 g/ml
Suhu kritis : 318,65 °C
Tekanan kritis : 41,8 atm (Kirk Othmer, 1996)

▪ Asam asetat glasial

Sifat fisika

Berat Molekul : 60,05 g/mol
Kepolaran : polar
Specific gravity : 1,049
Boiling point : 118,1 °C
Berat jenis : 1,0468 g/ml
Panas pembakaran pada 250 C : - 484.500 J/mol
Panas pembentukan pada 250 C : - 374.600 J/mol
Panas penggabungan : 46,68 cal/g
Titik Kritis : Tekanan = 5,74 kPa - Temperatur = 591,95 K

Larut dalam air, ethanol, dan eter dalam segala perbandingan dan merupakan pelarut yang baik untuk senyawa-senyawa organik. (Perry ed.1984)

▪ N-heksana

N-Heksana merupakan salah satu pelarut non-polar, yang sering digunakan dalam mengekstraksi suatu ekstrak. n-Heksana adalah bahan kimia yang dibuat dari minyak mentah. N-Heksana murni adalah cairan tidak berwarna dengan bau sedikit tidak menyenangkan. Bersifat sangat mudah terbakar, dan uap yang dapat meledak. n-Heksana murni banyak digunakan di laboratorium. Sebagian besar n- heksana digunakan dalam industri dicampur dengan bahan kimia serupa yang disebut pelarut (TSDR, 2008).

Sifat fisika

Bobot molekul: 86,2 gram/mol

Warna : Tak berwarna

Wujud : Cair

Kepolaran : nonpolar

Titik Lebur : -95°C

Titik Didih : 69°C (pada 1 atm)

Densitas : 0,6603 gr/ml pada 20°C

▪ Aseton

Aseton dengan nama lain dimetil keton, dimetilformaldehida mempunyai sifatsifat antara lain:

Sifat Fisika

Rumus molekul : C₃H₆O

Berat molekul, g/gmol : 58,08

Kenampakan : cairan tak berwarna

Kepolaran : polar

Titik didih, °C : 56,29

Titik beku, °C : -94,6

Viskositas (20 °C),cP : 0,32

Specific Gravity (20 °C) : 0,783

Temperatur kritis, °C : 235,05

Tekanan kritis (20 °C), kPa : 4.701

Sangat larut dalam air (Kirk & Othmer, 1983)

Tabel 2. 1 Indeks Polaritas Eluen

Pelarut	Indeks Polaritas
Khloroform	4,1
Methanol	5,1
Toluen	2,4
Asam asetat glasial	6,2
N-heksan	0,1
Aseton	5,1

2.3.4. Proses Penotolan, Hasil Pemisahan dan Pengukuran

Pada umumnya, sampel secara manual ditotolkan melalui pipa kapiler, mikropipet atau melalui penyuntik mikro kaca yang telah terkalibrasi, sehingga tetesan tepat menyentuh permukaan lempeng atau plat, sementara ujung alat penotol masih tetap di atas penyerap lempeng KLT. Pemisahan pada kromatografi lapis tipis yang optimal diperoleh jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Sebagaimana dalam prosedur kromatografi yang lain, jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda. Metode penotolan sampel secara otomatis diperlukan untuk menghasilkan reproduibilitas yang baik, dan diperlukan untuk analisis kuantitatif. Untuk memperoleh reproduibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5 μ l. Jika volume sampel yang ditotolkan lebih besar dari 2-10 μ l maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan.

Suksesnya pemisahan secara kromatografi lapis tipis tergantung pada proses lokalisasi bercak. Untuk deteksi bercak yang berwarna, maka dapat dipisahkan secara visual. Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan pencacahan radioaktif dan fluoresensi menggunakan ultraviolet (Sastrohamidjojo, 2005).

Setelah dilakukan elusi, maka plat akan menghasilkan bercak atau spot warna yang dapat diukur nilai Rf-nya. Untuk mendeteksi bercak-bercak tersebut dapat dilakukan dengan pengamatan secara langsung, menggunakan sinar UV, atau diberi pereaksi untuk membentuk warna.

Fluoresensi sinar ultraviolet terutama untuk senyawa yang dapat berfluoresensi maka bercak akan terlihat jelas. Jika senyawa tidak dapat berfluoresensi maka bahan penyerapnya diberi indikator yang berfluoresensi, dengan demikian bercak akan kelihatan hitam sedang latar belakangnya akan kelihatan berfluoresensi. Berikut adalah cara-cara kimiawi untuk mendeteksi bercak:

- Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan seluruh solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang-kadang lempeng dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan untuk meningkatkan intensitas warna bercak.

- Mengamati lempeng di bawah lampu ultra violet yang dipasang pada panjang gelombang emisi 254 atau 366 untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam. Lempeng yang diperdagangkan dapat dibeli dalam bentuk lempeng yang sudah diberi dengan senyawa fluoresen yang tidak larut yang dimasukkan ke dalam fase diam untuk memberikan dasar fluoresensi atau dapat pula dengan menyemprot lempeng dengan reagen fluorogenik setelah dilakukan pengembangan. Adapun sinar UV366 dapat digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa yang berfluoresensi secara alami.
- Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat diikuti pemanasan untuk mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam sampai kecoklatan.
- Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam chamber tertutup.
- Melakukan scanning pada permukaan lempeng dengan densitometer, suatu instrumen yang dapat mengukur intensitas radiasi dan direfleksikan dari permukaan lempeng ketika disinari dengan lampu UV atau lampu sinar tampak. Solut-solut yang mampu menyerap sinar akan dicatat sebagai puncak (peak) dalam pencatat (recorder).

2.3.5. Penetapan Harga Rf

Faktor retensi (Rf) adalah jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh eluen. Nilai Rf sangat karakteristik untuk senyawa tertentu pada eluen tertentu. Hal tersebut dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya perbedaan senyawa dalam sampel. Senyawa yang mempunyai Rf lebih besar berarti mempunyai kepolaran yang rendah, begitu juga sebaliknya. Hal tersebut dikarenakan fasa diam bersifat polar. Senyawa yang lebih polar akan tertahan kuat pada fasa diam, sehingga menghasilkan nilai Rf yang rendah. Rf KLT yang bagus berkisar antara 0,2 - 0,8. Jika Rf terlalu tinggi, maka harus mengurangi kepolaran eluen, dan sebaliknya (Sastrohamidjojo, 1991).

Harga Rf merupakan parameter karakteristik kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis. Harga ini merupakan ukuran kecepatan migrasi suatu senyawa pada kromatogram dan pada kondisi konstan merupakan besaran karakteristik dan reproduksibel. Harga Rf didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak senyawa dari titik awal (b) dan jarak tepi muka pelarut dari titik awal (a).

Seperti halnya pada kertas harga Rf didefinisikan sebagai berikut:

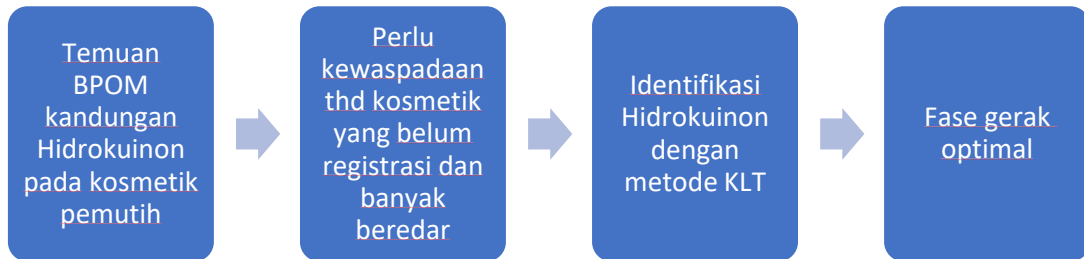
$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

Faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda dalam kromatografi lapisan tipis yang juga mempengaruhi harga R_f (Sastrohamidjoyo, 1991) adalah:

- Struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan.
- Sifat dari penyerap dan derajat aktifitasnya (biasanya aktifitas dicapai dengan pemanasan dalam oven, hal ini akan mengeringkan molekul-molekul air yang menempati pusat-pusat serapan dari penyerap). Perbedaan penyerap akan memberikan perbedaan yang besar terhadap harga R_f meskipun menggunakan fasa bergerak dan solute yang sama tetapi hasil akan dapat diulang dengan hasil yang sama, jika menggunakan penyerap yang sama, ukuran partikel tetap dan jika pengikat (kalau ada) dicampur hingga homogen.
- Tebal dan kerataan dari lapisan penyerap, dalam prakteknya tebal lapisan tidak dapat dilihat pengaruhnya, tetapi perlu diusahakan tebal lapisan yang rata. Ketidakrataan akan menyebabkan aliran pelarut menjadi tak rata pula dalam daerah yang kecil dari plat.
- Pelarut (dan derajat kemurniannya) sebagai fasa bergerak. Kemurnian dari pelarut yang digunakan sebagai fasa bergerak dalam kromatografi lapisan tipis adalah sangat penting dan bila campuran pelarut digunakan maka perbandingan yang dipakai harus betul-betul diperhatikan.
- Derajat kejenuhan dan uap dalam bejana pengembangan yang digunakan.
- Teknik percobaan. Arah pelarut bergerak di atas plat. (Metoda aliran penaikan yang hanya diperhatikan, karena cara ini yang paling umum meskipun teknik aliran penurunan dan mendatar juga digunakan).
- Jumlah cuplikan yang digunakan. Penetasan cuplikan dalam jumlah yang berlebihan memberikan hasil penyebaran noda-noda dengan kemungkinan terbentuknya ekor dan efek tak kesetimbangan lainnya, hingga akan mengakibatkan kesalahan-kesalahan pada harga-harga R_f .
- Suhu. Pemisahan-pemisahan sebaiknya dikerjakan pada suhu tetap, hal ini terutama untuk mencegah perubahan-perubahan dalam komposisi pelarut yang disebabkan oleh penguapan atau perubahan-perubahan fasa.
- Kesetimbangan. Ternyata bahwa kesetimbangan dalam lapisan tipis lebih penting dalam kromatografi kertas, hingga perlu mengusahakan atmosfer dalam bejana jenuh dengan uap pelarut. Suatu gejala bila atmosfer dalam bejana tidak jenuh dengan uap pelarut, bila digunakan pelarut campuran, akan terjadi pengembangan dengan permukaan pelarut yang berbentuk cekung dan fasa bergerak lebih cepat pada bagian tepi-tepi dan keadaan ini harus dicegah (Sastrohamidjoyo, 1991).

2.4. Kerangka Konsep

Berdasarkan hal – hal yang dipaparan diatas, maka kerangka pikir penelitian ditunjukkan pada gambar dibawah ini:



Gambar 2. 5 Kerangka Konsep