

Kimia Analitik Instrumentasi

Sebuah Pengantar dengan Aplikasinya dalam Analisis Pigmen Alami

TATAS HARDO PANINTINGJATI BRODOSUDARMO
LEENAWATY LIMANTARA
HERIYANTO



**Penerbit
Salemba Teknika**



>> Buku Asli Berstiker Hologram

Kimia Analitik Instrumentasi

Sebuah pengantar dengan aplikasinya dalam analisa pigmen alami

Edisi pertama

Penulis

Tatas Hardo Panintingjati Brotosudarmo, Dipl.Chem., Ph.D.

Leenawaty Limantara, M.Sc., Ph.D.

Heriyanto, M.Si, M.Sc.

Daftar Isi

Daftar Isi.....	i
Daftar gambar.....	iv
Daftar tabel.....	vii
Kata Pengantar.....	viii
BAB 1 Pendahuluan.....	1
Konsep dalam kimia analitik instrumentasi.....	1
Pendekatan kimia analitik.....	2
Mendefinisikan permasalahan.....	2
Mendesain metode analisa.....	3
Persiapan sampel.....	3
Melakukan pengukuran.....	4
Validasi metode.....	6
Soal-soal pertanyaan.....	8
BAB 2 Dasar separasi analitik dengan kromatografi.....	10
Teori kromatografi.....	10
<i>Konstanta distribusi</i>	11
<i>Waktu retensi</i>	12
<i>Hubungan antara laju migrasi dan konstanta distribusi</i>	12
<i>Faktor retensi, K</i>	13
<i>Faktor Selektivitas</i>	13
<i>Resolusi kolom</i>	13
Kromatografi cair kinerja tinggi.....	15
<i>Instrumentasi dalam KCKT</i>	15
<i>Pompa</i>	17
<i>Injektor</i>	17
<i>Kolom</i>	18
<i>Detektor</i>	18
<i>Degasser</i>	19
<i>Pemanas (oven) kolom</i>	19
Kolom fase terbalik (<i>reverse-phase column</i>).....	20
Kolom fase normal.....	21
Kolom <i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i> (HILIC).....	22
Soal-soal pertanyaan.....	22
BAB 3 Kromatografi Cair-Spektrometri Massa.....	23
Komponen-komponen dalam Sistem LC-MS.....	24
Sistem Ionisasi Tekanan Atmosfer.....	25
Unit Analisis.....	27
<i>Instrumentasi pada Kuadropol</i>	27
<i>Karakteristik Quadropole MS</i>	29
<i>Ruang Tubrukan (Collision Cell)</i>	30
Jenis Mode Analisa.....	30
Spektra Massa.....	33
Soal-soal pertanyaan.....	34
BAB 3 Spektroskopi.....	35

Konsep dasar interaksi gelombang elektromagnetik dan molekul	35
Konsep spektroskopi absorpsi.....	36
Spektroskopi absorpsi uv-tampak	37
<i>Konsep dasar untuk molekul</i>	37
<i>Instrumentasi spektroskopi uv-tampak</i>	40
<i>Sifat spektroskopis uv-tampak dari klorofil</i>	41
<i>Sifat spektroskopis uv-tampak dari karotenoid</i>	44
Spektroskopi inframerah.....	46
<i>Konsep dasar vibrasi</i>	46
<i>Tipe eksitasi vibrasi</i>	47
<i>Satuan pengukuran</i>	48
<i>Instrumentasi spektrometer inframerah</i>	48
<i>Persiapan sampel</i>	49
<i>Analisis spektrum IR</i>	50
Soal-soal pertanyaan.....	51
BAB 4 Metode analitik klorofil.....	52
Pengumpulan dan penyimpanan bahan	52
Penyiapan bahan	53
Ekstraksi pigmen	53
Metode pengukuran pada sampel ekstrak kasar	55
<i>Metode spektrofotometri absorpsi</i>	55
<i>Metode penentuan klorofil sebagai feofitin dan pengukuran jumlah klorofil relatif serta produk kerusakannya dalam campuran</i>	60
<i>Metode Fluorimetrik</i>	62
<i>Metode non-destruktif</i>	62
Metode pemisahan	63
<i>Kromatografi kolom</i>	64
<i>Kromatografi Kertas</i>	66
<i>Kromatografi Lapis Tipis (KLT)</i>	66
BAB 5 Metode Analitik Karotenoid.....	69
Ekstraksi	69
Saponifikasi	69
Penentuan kuantitatif	70
Menghilangkan sterol.....	70
Kromatografi	70
Kolom Kromatografi.....	71
Kromatografi Lapis Tipis	71
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	72
Identifikasi Karotenoid	73
Uji Kimia Karotenoid	73
<i>Uji karoten dengan reaksi Carr-Price</i>	73
<i>Uji gugus epoksida</i>	74
<i>Uji gugus karbonil</i>	74
<i>Uji gugus hidroksi</i>	74
BAB 6 Proyek mini mahasiswa.....	76
Analisa Komposisi dan Kandungan Pigmen Dominan Pada Padina australis dan Padina gymnospora yang Dikoleksi dari Sunset Beach, Kepulauan Karimunjawa, Indonesia (dikerjakan dan dilaporkan oleh Gita Claudia).....	76
<i>Bahan dan metode</i>	76
<i>Hasil dan pembahasan</i>	78

<i>Pustaka</i>	80
Ekstraksi dan Pemurnian Bixin (dikerjakan dan dilaporkan oleh Lidwina Angelica dan Stefani Rebeca)	81
<i>Bahan dan metode</i>	81
<i>Sampel</i>	81
<i>Hasil dan pembahasan</i>	81
<i>Pustaka</i>	82
Ekstraksi, Isolasi, Pemurnian, Identifikasi dan Kurva Standar β -karoten (dikerjakan dan dilaporkan oleh Lidwina Angelica dan Stefani Rebeca).....	83
<i>Bahan dan Metode</i>	83
<i>Hasil dan Pembahasan</i>	85
<i>Daftar Pustaka</i>	100
Pemisahan Isomer Fukosantin Menggunakan KCKT (dikerjakan dan dilaporkan oleh Arif Agung Wibowo).....	101
<i>Bahan dan Metoda</i>	101
<i>Hasil dan Pembahasan</i>	102
Analisa Fukosantin Menggunakan FTIR (dikerjakan dan dilaporkan oleh Arif Agung Wibowo).....	104
<i>Bahan dan Metoda</i>	104
<i>Hasil dan Pembahasan</i>	104
<i>Daftar Pustaka</i>	105
Lampiran Analisa Pigmen Standar NATChrom	106
Petunjuk Penggunaan Instrumen LCMS-8030 Shimadzu	118
Menghidupkan dan Mematikan Kondisi Vakum pada LCMS-8030	118
Menggunakan Instrumen LCMS-8030 untuk Analisa Pigmen	122
<i>Tujuan</i>	122
<i>Preparasi Sampel</i>	122
<i>Parameter LCMS</i>	122
Daftar Pustaka	143
Glosarium.....	149
Indeks.....	151

Daftar gambar

Gambar 1.	Langkah proses persiapan sampel dalam analisa sampel _____	4
Gambar 2.	Pola khas kurva kalibrasi _____	5
Gambar 3.	Kategori kromatografi dan hubungannya satu dengan lain menurut Duvivant dan Ginsbach. _	10
Gambar 4.	Pemisahan ekstrak pigmen fotosintesis yang terjadi pada kromatografi kolom. Tampak pita-pita berwarna terpisah akibat interaksi dengan resin pada kolom _____	11
Gambar 5.	Diagram plot kromatogram yang menunjukkan analisa identifikasi senyawa A, B dan C berdasarkan waktu retensi dan luas pita. _____	11
Gambar 6.	Pita-pita komponen A dan B yang terpisah dengan baik dan parameter untuk determinasi resolusi (RS). Tampak jelas resolusi pemisahan pita A dan B pada kromatogram (b) lebih tinggi dibanding pemisahan pada kromatogram (a). _____	14
Gambar 7.	Jumlah pelat teoritis menunjukkan efisiensi kolom sehingga dapat membedakan antara kolom yang baik dan kolom yang buruk. Informasi jumlah pelat teoritis dapat diketahui dari lembar spesifikasi kolom yang dikeluarkan oleh pabrikannya. _____	14
Gambar 8.	Skema diagram blok instrumentasi KCKT tipe high-pressure _____	15
Gambar 9.	Sistem KCKT analitik dari Shimadzu yang terdapat di laboratorium MRCP yang digunakan oleh mahasiswa sarjana strata-1, Program Studi Kimia, Universitas Ma Chung. _____	16
Gambar 10.	Pompa KCKT dari Shimadzu seri LC-20AD _____	17
Gambar 11.	Gambar skematis sistem injektor KCKT _____	18
Gambar 12.	(a) Berbagai jenis dan tipe kolom dan injektor yang digunakan oleh mahasiswa. (b) Pemasangan yang tepat dari kolom dengan memperhatikan arah aliran pelarut dan penempatan kolom penjaga (guard column) untuk mengamankan kolom dari kemungkinan pengotor yang masuk. _____	18
Gambar 13.	Ilustrasi perbandingan efek penggunaan temperatur pemanas kolom yang berbeda saat pemisahan pigmen fotosintesis dari ekstrak daun suji (<i>Pleomele angustifolia</i>). Pita-pita diberikan nomor secara berurutan adalah pigmen violaksantin, zeaksantin, klorofil a, klorofil b, alfa-karoten dan beta-karoten. _____	19
Gambar 14.	Struktur molekul C18 _____	20
Gambar 15.	Ilustrasi perbandingan penggunaan kolom yang berbeda (C8 dan C18) untuk memisahkan pigmen fotosintesis dari ekstrak daun suji (<i>Pleomele angustifolia</i>). Pita-pita diberikan nomor secara berurutan adalah pigmen violaksantin, zeaksantin, klorofil a, klorofil b, alfa-karoten dan beta-karoten. _____	21
Gambar 16.	KCKT yang terkoneksi dengan spektroskopi massa (HPLC-ESI-MS/MS) dengan tipe LCMS-8030 dari Shimadzu yang digunakan mahasiswa Program Studi Kimia, Universitas Ma Chung, Malang. _	23
Gambar 17.	Ilustrasi data yang dihasilkan berupa kromatogram dan spektrum MS _____	24
Gambar 18.	Skema komponen-komponen dalam sistem LC-MS (Shimadzu, 2010) _____	25
Gambar 19.	Sistem evaporasi dalam metode ionisasi elektro spray (ESI) (Shimadzu, 2010) _____	25
Gambar 20.	Reaksi ion-molekul dari sistem APCI (Shimadzu, 2010) _____	26
Gambar 21.	Skema menunjukkan hubungan antara metode ionisasi dan polaritas analit yang berlaku. Karena berbagai senyawa yang sangat besar dapat diukur menggunakan KCKT saja, penggunaan ESI atau APCI secara selektif karena metode ionisasi sekarang memungkinkan pengukuran jangkauan yang lebih luas dari senyawa organik juga. _____	27
Gambar 22.	Diagram tampak samping sistem kuadropol (gambar atas) dan sistem kuadropol rangkap tiga (triple quadrupole) spektrometri massa (Shimadzu, 2010) _____	28
Gambar 23.	Wilayah stabil untuk ion di sistem kuadropol MS (diagram Mathieu) (Shimadzu, 2010). _____	29
Gambar 24.	Diagram skema sistem kuadropol pada dua sistem spektrometri massa tipe kuadropol tunggal (single quadrupole) dan tiga kuadropol (triple quadrupole). Shimadzu memiliki sistem seri LCMS-2020 untuk kuadropol tunggal dan LCMS-8030/8040 untuk tiga kuadropol. _____	29
Gambar 25.	Ilustrasi pemindaian dari m/z 100 s.d. 600 dengan menunjukkan parameter waktu kejadian (event time). _____	30
Gambar 26.	Diagram ilustrasi contoh mode pengukuran SIM pada m/z 100, 200 dan 600 dengan waktu kejadian (event time) yang ditentukan. _____	31
Gambar 27.	Diagram pengukuran dengan menggunakan mode Precursor Ion Scan (Shimadzu, 2010) _____	31
Gambar 28.	Diagram pengukuran dengan menggunakan mode Product Ion Scan (Shimadzu, 2010). _____	31
Gambar 29.	Diagram pengukuran dengan menggunakan mode Neutral Loss Scan (Shimadzu, 2010). _____	32

Gambar 30.	Diagram pengukuran dengan menggunakan mode MRM (Shimadzu, 2010). _____	32
Gambar 31.	Spektra massa dari vitamin B2 dengan menggunakan metode EI (atas) dan ESI (bawah). _____	33
Gambar 32.	Spektrum dissosiasi tabrakan terinduksi dari senyawa reserpine yang didapatkan dengan pengukuran mode Product Ion Scan untuk mengamati fragmen-fragmen ion yang dihasilkan dari prekursor pada m/z 609. _____	34
1.	Apakah keuntungan yang ditawarkan oleh spektrometri massa sebagai detektor pada KCKT dibandingkan dengan detektor UV-Vis? _____	34
2.	Berikan penjelasan cara kerja kedua sistem ionisasi tekanan atmosfer! _____	34
3.	Mengapa tipe ionisasi ESI dinamakan ionisasi lembut? Jenis senyawa seperti apa yang cocok dianalisa dengan ESI? Bagaimanakah ion yang terbentuk melalui ionisasi ESI? _____	34
4.	Apakah yang dimaksud dengan ion prekursor dan ion produk? _____	34
5.	Jelaskan apakah yang disebut _____	34
Gambar 33.	Bentuk teori klasik gelombang penggambaran dari radiasi elektromagnetik _____	35
Gambar 34.	Spektrum elektromagnetik. _____	37
Gambar 35.	Ilustrasi efek menggandakan jarak tempuh pada intensitas penyerapan _____	37
Gambar 36.	Serapan foton yang memiliki energi yang tepat dengan energi antara orbital ikatan dan orbital anti-ikatan dapat menghasilkan eksitasi suatu elektron antara keadaan ini. _____	38
Gambar 37.	Daerah dimana beberapa pelarut umum tidak menyerap di daerah 180-250 nm dalam spektroskopi uv-tampak. _____	39
Gambar 38.	Diagram orbital molekuler etena, butadiena dan heksatriena dan penurunan celah energi HOMO-LUMO. _____	40
Gambar 39.	Konfigurasi pengaturan sistem double beam – double detector dari spektrofotometer seri UV-1600, UV-1700 dan UV-1800 dari Shimadzu. Gambar diperoleh dan dengan ijin dari Shimadzu Asia Pacific Pte. Ltd. melalui PT. Ditek Jaya. _____	41
Gambar 40.	Struktur molekuler beberapa klorofil dan bakterioklorofil. Tanda panah menunjukkan momen dipol Qx dan Qy. _____	42
Gambar 41.	Contoh spektra serapan klorofil (Chl) a, b, c dan bakterioklorofil (Bchl) a dalam pelarut organik. Spektra telah dinormalisasikan pada puncak pita Soret. _____	42
Gambar 42.	Pola orbital terluar dari porfirin menurut model 4-orbital Gouterman ditunjukkan dalam warna. Orbital-orbital egx dan egy: LUMO; a _{2u} and a _{1u} : HOMO; klasifikasi menurut simetri D _{4h} . Di sini fase yang berbeda dari orbital p ditampilkan dalam warna merah (+) dan biru (-). Panah besar menunjukkan sumbu x dan y. _____	43
Gambar 43.	Skema energi dari orbital molekuler untuk porfirin, klorin dan bakterioklorin _____	43
Gambar 44.	Struktur isoprenoid, sistem penggabungannya, serta beberapa contoh golongan karotenoid. _	45
Gambar 45.	Ciri khas karotenoid dengan simetri kelompok titik C _{2h} dimana transisi S ₀ →S ₂ yang diijinkan, serta contoh spektrum dari fukosantin dalam heksan yang menunjukkan struktur halus tiga jari dan spektra isomerisasi fukosantin yang terlihat pada pita cis. _____	46
Gambar 46.	Spektra lutein dan fukosantin dalam berbagai pelarut organik memperlihatkan dimana perbedaan gugus keton mempengaruhi struktur halus tiga jari. _____	46
Gambar 47.	Diagram mode vibrasi pada molekul XY ₂ . _____	48
Gambar 48.	Gambar skematis spektrometer IR dengan transformasi Fourier. _____	49
Gambar 49.	Spektrometer FT-IR dan asesorisnya berupa alat pengepres untuk membuat tablet cuplikan dengan bubuk KBr dan attenuated total reflection (ATR) untuk sampel cair. Spektrometer Jasco FT/IR-6800 digunakan dalam praktikum kimia analitik instrumentasi mahasiswa S1 program studi kimia, Universitas Ma Chung. _____	49
Gambar 50.	Daerah serapan IR dari gugus-gugus fungsional yang umum _____	50
Gambar 51.	Kromatografi lapis tipis dengan menggunakan silika gel. Ket: (1) karoten limbah serabut kelapa sawit; (2) fraksi 1, (3) fraksi 2, (4) fraksi 3 dari karoten hasil purifikasi limbah serabut; (5) karotenoid kelapa sawit segar; 6) karotenoid ekstrak wortel dan (7) marker β-karoten _____	71
Gambar 52.	Kromatogram tiga dimensi (3D) KCKT dengan deteksi PDA pada kisaran penyerapan uv-tampak dari sampel rumput laut terlihat bahwa spektrum karotenoid pada menit-menit awal dapat dipisahkan dengan baik dari klorofil. _____	72
Gambar 53.	Uji kimia karotenoid sebelum (kiri) dan sesudah (kanan) ditambah reagen Carr-Price _____	73
Gambar 54.	Isomerisasi 5,6-epoxide menjadi 5,8-epoxide karena asam _____	74
Gambar 55.	Peta lokasi pengambilan sampel rumput laut coklat di Sunset Beach, Kepulauan Karimun Jawa, Indonesia. _____	76

Gambar 56.	Foto 4 jenis rumput laut coklat, <i>S. polycystum</i> (a), <i>S. crassifolium</i> (b), <i>P. australis</i> (c), dan <i>P. gymnospora</i> (d) dengan informasi mengenai ukuran dari setiap jenis rumput laut. _____	76
Gambar 57.	Spektra serapan ekstrak pigmen dari 4 jenis rumput laut, <i>S. crassifolium</i> , <i>S. polycystum</i> , <i>P. australis</i> dan <i>P. gymnospora</i> , dalam aseton. Nilai absorbansi dalam 1 g berat kering rumput laut. _____	77
Gambar 58.	Kromatogram KCKT yang dideteksi pada 430 nm ekstrak pigmen dari 4 jenis rumput laut, <i>S. crassifolium</i> , <i>S. polycystum</i> , <i>P. australis</i> dan <i>P. gymnospora</i> , dalam aseton. Nilai absorbansi dalam 1 g berat kering rumput laut. _____	79
Gambar 59.	Struktur molekul dari bixin _____	81
Gambar 60.	Spektra serapan ekstrak bixin kasar dari pustaka (Kurniawati dkk., 2007) (a) dan hasil penelitian (b) dalam pelarut aseton serta spektra serapan bixin murni dari pustaka (Britton dkk., 2004) (c) dan hasil penelitian (d) dalam pelarut etanol. _____	82
Gambar 61.	Struktur molekul dari β -karoten _____	85
Gambar 62.	Spektra serapan ekstrak kasar β -karoten dalam pelarut heksana dari hasil ekstraksi ke-1 (garis hitam) dan hasil ekstraksi ke-2 (garis merah). _____	85
Gambar 63.	Spektra serapan β -karoten sebelum (garis hitam) dan setelah kromatografi kolom (garis biru) dalam pelarut heksana. _____	86
Gambar 64.	Pemisahan pigmen β -karoten dari hasil KCKT menggunakan kolom C30 yang dideteksi pada panjang gelombang 450 nm. _____	87
Gambar 65.	Spektra serapan karotenoid dalam pelarut KCKT dari 5 puncak yang berhasil dipisahkan dengan KCKT _____	87
Gambar 66.	Kromatogram KCKT yang dideteksi pada 450 nm (a), spektrum serapan dalam pelarut KCKT (b) dan kromatogram MS (c) dari β -karoten dengan analisa Q1 dan Q3 scan _____	89
Gambar 67.	Spektra MS dari β -karoten berdasarkan hasil Q1 scan (+) (a), Q3 scan (+) (b), Q1 scan (-) (c), dan Q3 scan (-) (d) _____	90
Gambar 68.	Spektra MS dari product ion scan Q3(+) dari β -karoten dengan CE = -10 V (a) dan CE = -35 V (b) _____	91
Gambar 69.	Spektra MS dari product ion scan Q3(+) dari β -karoten dengan CE = -10 V (a) dan CE = -35 V (b) _____	92
Gambar 70.	Spektra MS dari precursor ion scan β -karoten dengan ion produk = 444,3 dan CE = -35 V (a), ion produk = 429,6 dan CE = -35 V (b), dan ion produk = 414,0 dan CE = -35 V (c) _____	93
Gambar 71.	Spektra MS dari hasil analisa neutral loss scan β -karoten dengan nilai fragmen yang hilang m/z 92,2; ion produk = 444,3 dan CE = -35 V (a), nilai fragmen yang hilang m/z 107,0; ion produk = 429,5 dan CE = -35 V (b), nilai fragmen yang hilang m/z 92,2; ion produk = 414,0 dan CE = -35 V (c). _____	94
Gambar 72.	Kromatogram MS (a) dan spektra MS dari Q1 (+) (b) serta Q3 (+) (c) dari analisa SIM β -karoten _____	95
Gambar 73.	Hasil MRM dari β -karoten pada transisi ke-1 m/z 444,35 (a), transisi ke-2 m/z 119,15 (b), transisi ke-3 m/z 105,20 (c) _____	96
Gambar 74.	Spektra serapan β -karoten dalam berbagai pelarut organik _____	96
Gambar 75.	Kurva standar β -karoten dengan beberapa variasi konsentrasi, yaitu 7 konsentrasi (a), 6 konsentrasi (b) dan 5 konsentrasi (c) _____	99
Gambar 76.	Kromatogram KCKT dari pemisahan isomer fukosantin pada kolom C30 menggunakan metode modifikasi II, III, V, dan VI. _____	102
Gambar 77.	Spektrum FTIR fukosantin dengan interval spektrum 400-4000 cm ⁻¹ (atas) dan 1200-1700 cm ⁻¹ (bawah) _____	105

Daftar tabel

Tabel 1.	Metode instrumental dari analisis _____	2
Tabel 2.	Parameter dalam metode-metode instrumentasi analisis _____	6
Tabel 3.	Bagian KCKT beserta fungsi yang didasarkan pada setup dari produk Shimadzu yang digunakan di laboratorium MRCPP oleh mahasiswa sarjana strata-1, Program Studi Kimia, Universitas Ma Chung. _____	16
Tabel 4.	Kromofor-kromofor dasar dan transisi elektroniknya _____	39
Tabel 5.	Kesalahan dalam koefisien serapan spesifik pada Mackinney (1941). Koefisien serapan spesifik dari klorofil <i>a</i> dan <i>b</i> dalam aseton 80% yang didapat dari Mackinney (1941) dan Porra et al. (1989) dibandingkan. Prosentase nilai kesalahan dihitung dengan mengasumsikan bahwa koefisien pada Porra et al. (1989) akurat. _____	57
Tabel 8.	Program elusi gradient dari campuran pelarut metanol (A), aseton (B) dan larutan amonium asetat (1 M) (C) pada pemisahan pigmen dari rumput laut coklat. _____	78
Tabel 9.	Identifikasi pigmen dari 4 jenis rumput laut coklat berdasarkan nilai waktu tambat (t_R) dan panjang gelombang serapan maksimum (λ_{maks}) yang dibandingkan dengan pustaka acuan (Heriyanto dkk., 2017) _____	79
Tabel 10.	Kandungan pigmen (mg/g berat kering sampel) menggunakan spektrofotometer UV-Tampak, yaitu kandungan klorofil <i>a</i> dan total karotenoid, dan KCKT yaitu kandungan klorofil <i>a</i> dan fukosantin. _____	80
Tabel 11.	Program elusi gradient dari campuran pelarut metanol (A), MTBE (B) dan air (C) pada pemisahan pigmen Bixin. _____	81
Tabel 12.	Program elusi gradient dari campuran pelarut metanol (A), MTBE (B) dan air (C) pada pemisahan pigmen β -karoten. _____	83
Tabel 13.	Parameter Umum LCMS _____	84
Tabel 14.	Parameter Khusus LCMS _____	84
Tabel 15.	Identifikasi puncak β -karoten dan turunannya hasil pemisahan dengan KCKT menggunakan kolom C30 berdasarkan waktu tambat dan λ_{mak} . _____	87
Tabel 16.	Data hasil pengujian kemurnian dari β -karoten menggunakan KCKT yang terdiri atas nomor puncak, waktu tambat, area, tinggi dan persentase area dari setiap puncak yang berhasil dipisahkan. Panjang gelombang deteksi pada 450 nm. _____	88
Tabel 17.	Keterangan Pre Bias dan CE pada hasil MRM dari β -karoten _____	95
Tabel 18.	Panjang gelombang serapan maksimum (λ_{mak}) untuk puncak II dan puncak III dari β -karoten dalam beberapa pelarut organik dari hasil penelitian ini dan pustaka acuan _____	97
Tabel 19.	Pengambilan Data Persiapan Variasi Pelarut untuk Kurva Standar _____	97
Tabel 20.	Hasil Perhitungan Pencarian Konsentrasi Variasi untuk Pembuatan Kurva Standar _____	98
Tabel 21.	Konsentrasi dan Area sebagai Parameter Pembuatan Kurva Standar _____	98
Tabel 22.	Program elusi gradien pemisahan isomer fukosantin menggunakan kolom C30 dari metode KCKT dengan modifikasi I sampai modifikasi VI _____	101
Tabel 23.	Sifat kromatografi dari pemisahan isomer fukosantin, yaitu resolusi (R_s), faktor kapasitas (k') dan selektivitas (α), serta nilai waktu tambat (t_R) dan identifikasi setiap isomer fukosantin, dengan metode modifikasi II, V, dan VI pada kolom C30 yang dideteksi pada panjang gelombang 450 nm. _____	103
Tabel 24.	Posisi puncak vibrasi dari spektrum FTIR fukosantin _____	104
Tabel 25.	Rangkuman identifikasi pigmen standar menggunakan LCMS berdasarkan panjang gelombang serapan maksimum (λ_{mak}), <i>molecular ion species</i> dan <i>fragment ions</i> _____	106

Kata Pengantar

Kimia analitik instrumentasi merupakan bagian dari ilmu kimia dalam penguasaan instrumentasi guna menganalisa kandungan senyawa-senyawa yang ada dalam bahan uji secara kualitatif dan kuantitatif. Dalam upaya melakukan analisa kandungan senyawa tersebut, seorang analis perlu dapat memisahkan senyawa yang akan dianalisa tersebut dari bagian yang lain. Setelah berhasil memisahkannya dan mendapatkannya dalam bentuk murni maka dilanjutkan dengan analisa-analisa karakterisasi misalnya untuk menentukan strukturnya secara utuh, mengetahui distribusinya, hingga bagaimana fungsi dari senyawa tersebut.

Pigmen alami fotosintesis merupakan senyawa yang memberikan warna-warni pada daun dan bunga dari tumbuhan tingkat tinggi dan tingkat rendah, hingga mikroorganisme fotosintesis seperti mikroalga, sianobakteria, dan bakteri fotosintetik ungu. Pigmen tersebut terdistribusi di alam dengan sangat limpah dan mudah teridentifikasi cepat dengan mata telanjang. Bila pembaca mengunjungi ekspo Food Ingredient, maka akan menemukan bahwa pigmen-pigmen alami ini telah secara komersial digunakan sebagai bahan baku atau *ingredient* pewarna makanan. Pigmen alami tersebut antara lain golongan klorofil dan karotenoid. Oleh sebab itu, pigmen fotosintesis menjadi obyek dan sistem pembelajaran yang ideal bagi mahasiswa tingkat sarjana strata satu untuk menguasai kimia analisis secara holistik dan aplikatif, serta kemudian mengembangkan keterampilan diri untuk sampel-sampel yang lebih sulit.

Buku ini dikembangkan dari buku sebelumnya yaitu Metode Analitik Spektroskopi dan Klorofil karya Dr. Leenawaty Limantara, yang ditulis ulang untuk disempurnakan oleh tim penulis sebagai buku ajar berikut, digunakan mula-mula untuk pembelajaran mahasiswa mata kuliah instrumentasi analitik, program studi kimia Universitas Ma Chung. Kami memutuskan untuk memperbanyak dalam bentuk cetak dengan tujuan agar dapat melengkapi literatur mahasiswa program studi kimia, maupun program studi dan fakultas lain seperti pangan dan teknologi pangan, pertanian, farmasi, bahkan teknik kimia.

Berdasarkan pengalaman penulis selama lebih dari 30 tahun terlibat dalam proses belajar mengajar di luar dan dalam negeri, penggunaan pigmen fotosintesis sebagai obyek dalam pembelajarannya dapat mengembangkan kemampuan berfikir analitik yang holistik dari mahasiswa secara signifikan yaitu dalam menerapkan prinsip analitik secara umum dan kemudian untuk dapat diterapkan pada senyawa-senyawa organik lainnya khususnya senyawa bahan alam. Pigmen fotosintesis kami gunakan dalam pembelajaran di matakuliah ini sebab sampel dapat dengan mudah kita dapatkan, bahkan dapat langsung diambil di taman depan laboratorium kami.

Secara khusus kami haturkan terimakasih kepada mahasiswa program studi kimia Universitas Ma Chung yaitu Gita Claudia, Arif Agung Wibowo, Lidwina Angelica, dan Stefani Rebeca yang telah menyelesaikan praktikum dengan baik sehingga hasil praktikum tersebut kami masukan dalam studi kasus analisa pigmen di buku ini. Kami memutuskan memasukan hasil karya praktikum mahasiswa tersebut dengan maksud agar pengguna buku ini memiliki kepercayaan diri dalam mencoba dan melakukan eksperimen yang terdapat pada buku ini. Semoga buku ini dapat bermanfaat bagi adik-adik mahasiswa sarjana strata satu dalam belajar kimia analitik lebih komprehensif.

Secara khusus tim penulis berterimakasih kepada Shimadzu Asia Pacific Pte. Ltd. dan PT Ditek Jaya sebagai agen tunggalnya atas kerjasamanya dan dukungannya dalam teknis di laboratorium dalam mengembangkan paket metode sehingga dapat diimplementasikan pada sistem yang ada dan ijin dalam menggunakan materi dan gambar-gambar instrumentasi untuk dapat dimuat dalam buku ini.

Malang, 6 September 2018

BAB 1 Pendahuluan

Konsep dalam kimia analitik instrumentasi

Kimia analitik identik dengan karakterisasi senyawa secara kualitatif dan kuantitatif. Kata karakterisasi akan kita selalu pakai dan memiliki makna yang luas. Karakterisasi dapat bermakna identifikasi dari suatu senyawa kimia atau elemen yang terdapat dalam suatu sampel, untuk menjawab pertanyaan misalnya “apakah dalam kapsul multivitamin terkandung senyawa vitamin E?” atau “senyawa apa saja yang terdapat pada teh hijau?” atau “apakah kapsul putih ini adalah aspirin?” atau “apakah metal kecil ini besi atau nikel?” Jenis karakterisasi yang menjawab pertanyaan apakah tersebut dikenal dengan analisis kualitatif. Analisis kualitatif merupakan identifikasi satu atau lebih jenis senyawa dalam suatu material. Kata karakterisasi juga dapat bermakna determinasi jumlah dari senyawa tertentu atau elemen terdapat dalam suatu sampel, untuk menjawab pertanyaan misalnya “berapa jumlah kandungan vitamin E dalam kapsul multivitamin?” atau “berapa perbandingan kandungan klorofil a dan katekin dalam teh hijau?” Determinasi berapa banyak senyawa yang terkandung dalam sampel itulah yang disebut analisis kuantitatif. Analisis kuantitatif membutuhkan determinasi jumlah pasti dari suatu senyawa dalam sampel tertentu. Jenis senyawa kimia yang dianalisa dapat berupa elemen, ion, senyawa organik atau senyawa anorganik. Wujudnya dapat berupa gas, padatan, atau cair. Karakterisasi dapat juga mengacu pada keseluruhan sampel atau sebagian misalnya pada pucuk daun teh saja yang telah menguning.

Karakterisasi dari senyawa bahkan dapat berlanjut lebih dari sekedar analisis kimia namun termasuk determinasi struktur, pengukuran sifat fisika dari senyawa tersebut, hingga pengukuran parameter kimia fisika seperti kinetika reaksi. Sebagai contoh pengukuran dalam perubahan isomerisasi struktur karotenoid β -karoten dari trans menjadi cis dan degradasinya yang dipicu oleh paparan cahaya tampak dalam waktu lama. Aplikasi yang begitu luas membuat kimia analitik menjadi suatu bidang yang mencakup semua bidang ilmu sains. Kimia analitik memiliki peran penting dalam kita mempelajari kimia organik, kimia anorganik, biokimia, kimia pangan, biotek, kimia medisinal, kimia lingkungan, pertanian, astronomi, kimia material tentang polimer, keramik, nanopartikel, dan masih banyak bidang disiplin ilmu sains yang lain.

Hampir puluhan tahun kimia analitik mengandalkan reaksi kimia untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi komponen terdapat dalam sampel. Metode klasik yang dikenal dengan metode analisa basah (*wet chemistry*) ini biasanya membutuhkan sebagian sampel diambil dan dilarutkan dalam pelarut yang cocok jika perlu, kemudian ditetaskan senyawa penguji sehingga reaksi kimia yang diinginkan untuk mengidentifikasi sampel berlangsung. Bidang kimia analitik yang menggunakan metode ini adalah misalnya analisa volumetrik dan gravimetri. Titrasi asam-basa, titrasi oksidasi-reduksi, dan uji benedict untuk karbohidrat adalah contoh dari metode analisa basah. Jenis metode ini membutuhkan keterampilan dan konsentrasi tinggi dari sang analis sendiri kalau ingin mencapai suatu hasil yang akurat dan presisi. Metode seperti ini cukup membuang banyak waktu dan untuk generasi zaman sekarang saat ini kurang cocok, apalagi perkembangan laboratorium R&D farmasi, laboratorium lingkungan komersial, dan laboratorium industri untuk kontrol kualitas yang menuntut pada konsep *high-throughput* untuk melakukan uji dengan cepat ribuan senyawa secara rutin dan membuang waktu. Bahkan jika perlu tanpa merusak atau menghancurkan sampel yang diuji, misalnya analisa forensik.

Metode analisa non-destruktif dan otomatisasi instrumen analisis semakin menjadi teknologi yang diminati dalam analisis kimia. Pengenalan komputer serta perangkat lunak operasi dan analisa menjadi kompetensi wajib dari seorang kimia analis. Dengan demikian sarjana strata satu wajib memiliki kompetensi dibidang kimia analitik instrumentasi tidak hanya secara teori saja namun juga praktik pengoperasian serta kemampuan daya nalar analitik untuk menginterpretasikan data yang dihasilkan oleh instrumen-instrumen analisis yang digunakan.

Pendekatan kimia analitik

Seorang analis dituntut kritis dan teliti dalam melakukan karakterisasi. Oleh sebab itu bagi seorang analis mendefinisikan permasalahan dengan tepat menjadi modal pertama sebelum memikirkan pendekatan-pendekatan analitik. Bila dirumuskan dalam suatu tahapan, maka berikut adalah tahapan-tahapan yang digunakan secara umum oleh seorang analis dalam melakukan analisa:

1. Mendefinisikan permasalahan
2. mendesain metode analisa
3. Sampling dan penyimpanan sampel
4. Persiapan sampel
5. Melakukan pengukuran
6. Menguji data
7. Melakukan validasi metode
8. Dokumentasi

Mendefinisikan permasalahan

Dalam proses mendefinisikan masalah seorang kimia analis wajib mencari tahu informasi yang detail tentang sampel, material atau proses yang sedang dipelajari, termasuk seberapa akurasi dan presisi informasi analitis tersebut akan dihasilkan, berapa banyak material atau sampel yang dibutuhkan, dan apakah sampel tersebut harus dianalisa tanpa perlu mendestruksinya. Pertanyaan-pertanyaan muncul dalam proses mendefinisikan masalah antara lain: Apakah sampel yang dianalisa organik atau anorganik? Apakah sampel tersebut murni atau masih campuran? Apakah sampel tersebut stabil dalam kondisi ruang? Apakah ada perlakuan khusus dibutuhkan agar sampel tidak rusak sebelum diuji? Apakah sampel bersifat homogen atau heterogen? Apakah sudah ada informasi terkait dengan sifat-sifat kimia dari sampel tersebut? Sangat dimungkinkan bahwa jawaban atas pertanyaan tersebut menjadi bagian permasalahan yang harus seorang analis pecahkan.

Apabila sampel adalah senyawa yang tidak diketahui, analis wajib mencari tahu apakah sampel tersebut organik atau anorganik, dalam keadaan murni atau campuran, sebagai bagian dari mencari solusi dari permasalahan yang ada. **Analit** merupakan substansi yang akan dianalisa atau subyek analisa, sedangkan yang lain dalam sampel dinamakan **matriks**. Tentu saja ada kemungkinan ada banyak analit dalam satu sampel yang akan diuji. Terminologi *analisis* digunakan pada sampel yang akan dipelajari, misalnya “air mineral akan dianalisis untuk kandungan ion nitratnya” atau “analisis tanah yang terkontaminasi telah dilakukan”, maka air mineral dan tanah tersebut merupakan sampel yang akan dianalisis. Sedangkan terminologi *determinasi* mengacu pada pengukuran yang dilakukan, misalnya “determinasi ion nitrat dalam air mineral” atau “determinasi kandungan sianida pada tanah”. Maka dalam kalimat tersebut ion nitrat dan sianida merupakan analit yang sedang diuji, sedangkan yang komponen selain itu yang dikenal dengan matriks mungkin akan menyebabkan interferensi dalam analisis atau pengukuran.

Tabel 1. Metode instrumental dari analisis

Metode	Kualitatif		Kuantitatif	
	Tingkat Elemen	Tingkat Molekular	Tingkat Elemen	Tingkat Molekular
Spektroskopi absorpsi atom	tidak	tidak	ya	tidak
Spektroskopi emisi atom	ya	tidak	ya	tidak
Elektroforesis kapiler	ya	ya	ya	ya
Elektrokimia	ya	ya	ya	ya
Kromatografi gas	tidak	ya	tidak	ya
Spektrometri masa-ICP	ya	tidak	ya	tidak
Spektrokopi inframerah	tidak	ya	tidak	ya
Kromatografi ion	ya	ya	ya	ya
Kromatografi cair	tidak	ya	tidak	ya

Spektrometri masa	ya	ya	ya	ya
Resonansi magnet inti	tidak	ya	tidak	ya
Spektroskopi raman	tidak	ya	tidak	ya
Analisis termal	tidak	ya	tidak	ya
Spektrofotometri UV/VIS	ya	ya	ya	ya
Absorpsi sinar-X	ya	tidak	ya	tidak
Difraksi sinar-X	tidak	ya	tidak	ya
Fluoresensi sinar-X	ya	tidak	ya	tidak

Mendesain metode analisa

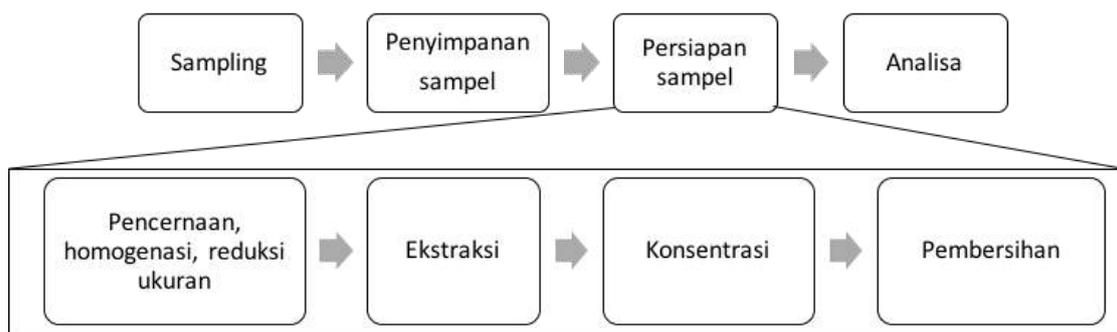
Setelah permasalahan dapat dengan jelas didefinisikan, selanjutnya prosedur analisa atau metode harus didesain untuk menyelesaikan permasalahan tersebut. Seorang analis dapat mendesain metode sedemikian rupa memenuhi kriteria tujuan tertentu, misalnya untuk mencapai akurasi dan presisi yang tinggi dengan menggunakan jumlah sampel yang dibatasi, atau mendesain metode dengan mempertimbangkan biaya analisa. Dalam mendesain metode, sangat penting bagi seorang analis mengetahui bagaimana mendapatkan sampel (*sampling*) yang mewakili populasi atau dikatakan representatif, bagaimana menyimpan sampel dengan baik sebelum proses analisa, bagaimana menyiapkan sampel saat analisa dilakukan, bagaimana proses dalam analisa menggunakan instrumentasi, hingga bagaimana mengolah data agar dihasilkan informasi yang berarti.

Ada banyak prosedur analisa dan metode-metode yang telah dikembangkan dan dipublikasikan di jurnal-jurnal baik nasional maupun internasional. Sebagai contoh jurnal Analytical Chemistry, Nature Protocols, Analytica Chimica Acta, Journal of Chromatography, dan sebagainya. Penelusuran artikel jurnal ilmiah yang memuat prosedur analisa dan metode tersebut dapat dilakukan melalui pencarian di google scholar, scopus, atau pubmed. **Sebagai catatan, apabila Anda tidak dapat mengakses file dalam .pdf dari mesin pencari tersebut maka Anda dapat *copy-paste* alamat website dari artikel yang Anda ingin dapatkan pada tautan: <https://sci-hub.tw>.** Selain dari referensi jurnal, pemilihan metode juga dapat mengacu pada standar yang telah dipublikasi dalam paten maupun standar nasional Indonesia (SNI) atau internasional. Namun demikian, untuk riset akademis sangat disarankan menggunakan referensi dari jurnal yang terkini sehingga memungkinkan riset akademis mengembangkan kebaruan dari prosedur dan metode tersebut lebih lanjut. Sedangkan prosedur analisa dan metode yang dipublikasi dalam standar nasional (SNI) atau dari buku teks biasanya mengacu pada metode yang lama telah terstandar

Seorang analis dapat mendekati pemecahan permasalahan dengan metode kualitatif dan/atau kuantitatif, bergantung pada hasil tujuan dari analisa tersebut, sebagaimana yang telah disinggung dalam perikop sub-bab konsep dalam kimia analitik instrumentasi. Ketika tujuan analisa dan target analisa telah diidentifikasi, maka metode yang telah didesain tersebut perlu diulas berdasarkan akurasi, presisi, biaya, dan parameter-parameter terkait lainnya. Jumlah tenaga analis, waktu yang digunakan, dan apakah terdapat otomatisasi merupakan hal yang penting.

Persiapan sampel

Ada suatu pertumbuhan yang belum pernah terjadi sebelumnya pada teknologi instrumentasi dalam beberapa dekade terakhir. Instrumentasi, seperti kromatografi, spektroskopi dan mikroskopi, serta sensor semikonduktor dan mikroprosesor, telah mengalami kemajuan yang signifikan. Meskipun pesatnya perkembangan teknologi instrumentasi tersebut, pengukuran non-invasi yang lengkap masih sulit dan mahal dilakukan dalam banyak kasus. Lebih sering daripada tidak, satu langkah penyiapan (*pretreatment*) atau lebih diperlukan. Langkah ini dikenal sebagai **persiapan sampel**, yang bertujuan pada pengayaan, pembersihan, dan peningkatan sinyal. Persiapan sampel sering menjadi hambatan dalam proses pengukuran, karena cenderung lambat dan padat karya. Dalam dua dekade terakhir terdapat evolusi yang cepat dan pertumbuhan eksplorisif dari bisnis penyiapan sampel. Ini terutama didorong oleh kebutuhan lingkungan dari misalnya industri farmasi, yang menganalisis sejumlah besar sampel yang membutuhkan upaya signifikan dalam persiapan sampel dalam waktu yang cepat.



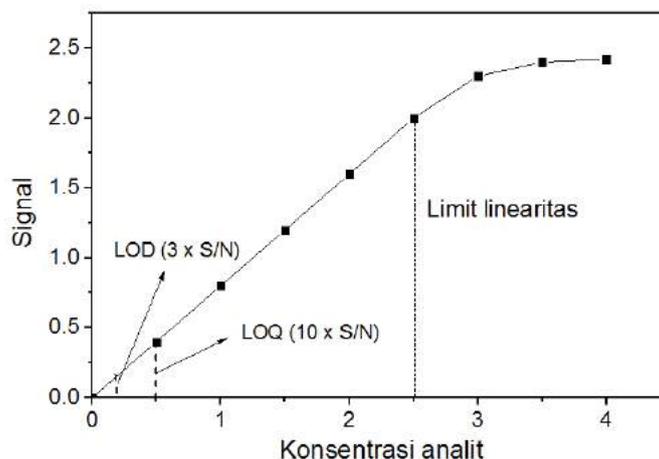
Gambar 1. Langkah proses persiapan sampel dalam analisa sampel

Persiapan sampel sangat penting dari semua aspek analisis kimia, biologi, material, dan analisis permukaan. Ciri khas teknologi persiapan sampel saat ini adalah lebih cepat, metode ekstraksi yang lebih hijau dan teknik-teknik ekstraksi mikro (bahkan nano). Persiapan sampel spesial, seperti analit yang dapat merakit sendiri (*self-assembly*) dan nanopartikel untuk peningkatan permukaan, juga telah berkembang. Perkembangan sangat mengesankan adalah terkait alat kinerja tinggi (*high-throughput*) untuk persiapan lebih cepat dengan presisi yang tinggi untuk analisis sejumlah sampel yang banyak sekaligus, misalnya teknologi Nexera UC *Supercritical Fluid Extraction* yang terkoneksi dengan sistem kromatografi yang dikembangkan oleh Shimadzu (Video YouTube: <https://youtu.be/LJLW7TmKQ1A>). Ada pula teknologi menggunakan pelat dengan jumlah sumur sebanyak 96 (bergerak menuju 384 sumur) dan teknologi robotik untuk memproses ratusan sampel per hari guna proses kristalisasi, sangat revolusioner di industri farmasi, misalnya teknologi yang dikembangkan oleh Rigaku (Video YouTube: <https://youtu.be/wZjLmzI4Btc>). Teknik fabrikasi mikro lanjutan juga telah menghasilkan pengembangan sistem analisis kimia miniatur yang termasuk preparasi sampel mikro pada chip.

Melakukan pengukuran

Hampir semua proses pengukuran, termasuk persiapan sampel dan analisis, memerlukan kalibrasi menggunakan suatu senyawa standar. Hubungan antara sinyal detektor dan jumlah analit diperoleh dengan merekam respons dari kuantitas yang diketahui merupakan tujuan dari **proses kalibrasi**. Demikian pula, jika langkah ekstraksi dilibatkan, penting untuk menambahkan jumlah analit yang diketahui ke matriks dan mengukur dengan tepat berapa analit yang berhasil diekstrak atau dikenal dengan istilah **pemulihan**. Proses semacam itu membutuhkan senyawa standar, yang dapat dipreparasi di laboratorium atau diperoleh dari sumber komersial.

Metode kalibrasi yang paling umum adalah dengan menyiapkan konsentrasi senyawa standar yang diketahui, yang mencakup rentang konsentrasi yang diharapkan dalam sampel. Matriks standar harus sedekat mungkin dengan matriks pada sampel. Misalnya, jika sampel akan diekstraksi dalam pelarut organik tertentu, standar harus juga disiapkan dengan pelarut yang sama. Kurva kalibrasi adalah plot respons detektor sebagai fungsi konsentrasi, seperti yang diilustrasikan pada Gambar 2. Kurva kalibrasi tersebut kemudian digunakan untuk menentukan jumlah analit dalam sampel yang tidak diketahui. Dengan mengukur sinyal dari analit dalam sampel, maka kita dapat menghitung perkiraan konsentrasi berdasarkan korelasi dari kurva kalibrasi tersebut.



Gambar 2. Pola khas kurva kalibrasi

Semua pengukuran tentunya tidak terlepas dari sejumlah **kesalahan** (*error*) tertentu, dan perkiraan besarnya diperlukan untuk memvalidasi hasil. Kesalahan tidak dapat dihilangkan sepenuhnya dalam setiap pengukuran, meskipun besarnya dan sifatnya dapat dikarakterisasi. Kesalahan juga dapat dikurangi dengan teknik yang ditingkatkan. Secara umum, kesalahan dapat diklasifikasikan menjadi dua yaitu **kesalahan acak** dan **kesalahan sistematis**. Jika percobaan yang sama diulangi beberapa kali, pengukuran individu mengelompok di sekitar nilai rata-rata. Perbedaan adalah karena faktor yang tidak diketahui yang bersifat stokastik dan ini disebut kesalahan acak. Mereka memiliki distribusi Gaussian dan probabilitas yang sama untuk berada di atas atau di bawah rata-rata. Di sisi lain, kesalahan sistematis cenderung bias pengukuran dalam satu arah. Kesalahan sistematis diukur sebagai penyimpangan dari nilai sebenarnya.

Akurasi, penyimpangan dari nilai sebenarnya, adalah ukuran kesalahan sistematis. Hal ini sering diperkirakan sebagai penyimpangan nilai rata-rata yang diukur (C_m) dari nilai sebenarnya (C_t):

$$akurasi = \frac{C_m - C_t}{C_t} \quad (1.1)$$

Nilai sebenarnya mungkin tidak diketahui. Untuk tujuan perbandingan, nilai rata-rata dari pengukuran terhadap sampel standar referensi dengan metode yang ditetapkan sebelumnya atau oleh lembaga terakreditasi yang diterima sebagai nilai yang sebenarnya.

Presisi adalah ukuran reproduktifitas (dapat ulang) dan dipengaruhi oleh kesalahan acak. Karena semua pengukuran mengandung kesalahan acak, hasil dari pengukuran tunggal tidak dapat diterima sebagai nilai sebenarnya. Perkiraan kesalahan ini perlu diprediksi dalam rentang apa nilai yang sebenarnya mungkin ada, dan ini dilakukan dengan mengulangi pengukuran beberapa kali. Dua parameter penting, nilai rata-rata dan variabilitas pengukuran, diperoleh dari proses ini. Ukuran nilai rata-rata yang paling banyak digunakan adalah rerata aritmetik, \bar{x} :

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (1.2)$$

dimana $\sum x_i$ adalah jumlah dari pengukuran yang mereplikasi dan n adalah jumlah total pengukuran. Karena kesalahan acak terdistribusi normal, ukuran umum variabilitas (atau presisi) adalah standar deviasi, σ . Ini dihitung sebagai:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (1.3)$$

Ketika kumpulan data terbatas, rata-rata sering dianggap sebagai nilai yang sebenarnya, dan standar deviasi mungkin diremehkan. Dalam hal ini, perkiraan yang tidak bias dari σ , yang ditunjuk s , dihitung sebagai berikut:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1.4)$$

Karena jumlah poin data menjadi lebih besar, nilai s mendekati nilai σ . Ketika n menjadi sebesar 20, persamaan untuk σ mungkin dapat digunakan. Istilah lain yang biasa digunakan untuk mengukur variabilitas adalah *koefisien variasi* (CV) atau *standar deviasi relatif* (RSD), yang juga dapat dinyatakan sebagai persentase:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \text{ atau } \%RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (1.5)$$

Deviasi standar relatif adalah parameter pilihan untuk menyatakan ketepatan dalam ilmu analitis.

Ketepatan sangat penting ketika persiapan sampel dilibatkan. Variabilitas juga dapat mempengaruhi akurasi. Sudah diketahui dengan baik bahwa reproduksi suatu analisis menurun secara tidak proporsional dengan penurunan konsentrasi. Secara umum, instrumen analitik telah menjadi sangat canggih dan memberikan tingkat akurasi dan presisi yang tinggi. Di sisi lain, persiapan sampel sering membutuhkan proses yang ketat yang menyebabkan sebagian besar variabilitas. Kembali ke contoh pengukuran senyawa aromatis dalam teh hijau, analisis akhir dapat dilakukan dalam kromatografi gas – spektrometri massa (GC-MS) yang terkoneksi dengan komputer yang telah memiliki basis data. Pada saat yang sama, persiapan sampel mungkin melibatkan homogenisasi sampel daun dalam grinder, ekstraksi dengan superkritis, peningkatan konsentrasi, filtrasi, penyerapan analit yaitu senyawa aromatis dalam sampel teh dengan misalnya *solid-phase microextraction* (SPME). Persiapan sampel mungkin memakan waktu berjam-jam atau bahkan berhari-hari pada beberapa kasus sampel lain, sedangkan analisis GC-MS dapat selesai dalam hitungan menit. Persiapan sampel juga melibatkan beberapa langkah terpisah yang melibatkan penanganan manual. Akibatnya, kesalahan acak dan sistematis lebih tinggi selama persiapan sampel daripada selama analisis.

Validasi metode

Kriteria yang digunakan untuk mengevaluasi metode analisis disebut angka-angka kelayakan. Berdasarkan karakteristik ini, seseorang dapat memprediksi apakah suatu metode memenuhi kebutuhan aplikasi tertentu. Angka-angka kelayakan tercantum dalam Tabel 2. Keakuratan dan ketelitian telah dibahas; karakteristik penting lainnya adalah sensitivitas, batas deteksi, dan kisaran kuantisasi.

Tabel 2. Parameter dalam metode-metode instrumentasi analisis

No	Parameter	Definisi
1	Akurasi	Penyimpangan dari nilai yang sebenarnya
2	Presisi	Reproduktivitas atau dapat ulangnya hasil dari replikasi pengukuran
3	Sensitivitas	Kemampuan untuk membedakan antara perbedaan kecil dalam konsentrasi
4	Limit deteksi	Konsentrasi terukur yang terendah
5	Rentang dinamis linier (<i>Linear Dynamic Range</i>)	Rentang linier dari kurva kalibrasi
6	Selektivitas	Kemampuan untuk membedakan analit dari interferensi
7	Laju analisa	Waktu yang dibutuhkan untuk persiapan dan analisa sampel
8	<i>Throughput</i>	Jumlah sampel yang dapat dijalankan dalam waktu tertentu periode
9	Kemudahan otomatisasi	Sebaik apakah sistem dapat diotomatisasi

10	<i>Ruggedness</i>	Ketahanan pengukuran, kemampuan untuk menangani kondisi buruk
11	Portabilitas	Kemudahan suatu instrumen dapat dipindahkan
12	<i>Greenness</i>	Efisiensi lingkungan dalam hal menimbulkan sampah dan konsumsi energi
13	Biaya	Biaya peralatan + biaya operasional + biaya kerja

Sensitivitas suatu metode (atau instrumen) adalah ukuran kemampuan suatu metode/instrumen untuk membedakan perbedaan-perbedaan kecil dalam konsentrasi analit pada tingkat keyakinan yang diinginkan. Ukuran sensitivitas yang paling sederhana adalah kemiringan kurva kalibrasi (Gambar 2) dalam rentang konsentrasi yang menarik. Ini disebut sebagai sensitivitas kalibrasi. Biasanya, kurva kalibrasi untuk instrumen bersifat linier dan diberikan oleh persamaan bentuk

$$S = mc + s_{bl} \quad (1.6)$$

dimana S adalah sinyal pada konsentrasi c dan s_{bl} adalah referensi (yaitu, sinyal dengan tidak adanya analit). Maka m adalah kemiringan kurva kalibrasi dan karenanya sensitivitas. Ketika persiapan sampel terlibat, pemulihan langkah-langkah ini harus diperhitungkan. Sebagai contoh, selama ekstraksi, hanya sebagian kecil proporsional dengan ekstraksi efisiensi r tersedia untuk analisis. Maka persamaan menjadi:

$$S = mrc + s_{t,bl} \quad (1.7)$$

Sekarang sensitivitasnya adalah mr daripada m . Semakin tinggi tingkat pemulihan, semakin tinggi sensitivitasnya. Hampir 100% pemulihan memastikan sensitivitas maksimum. Referensi juga dimodifikasi dengan langkah persiapan sampel; $s_{t,bl}$ mengacu pada referensi yang muncul dari kontribusi total dari persiapan dan analisis sampel.

Karena presisi menurun pada konsentrasi rendah, kemampuan untuk membedakan antara perbedaan konsentrasi kecil juga menurun. Oleh karena itu, kepekaan sebagai fungsi presisi diukur oleh sensitivitas analitis, yang dinyatakan sebagai:

$$a = \frac{mr}{s_s} \quad (1.8)$$

dimana s_s adalah standar deviasi berdasarkan pada persiapan sampel dan analisis. Karena ketergantungannya pada s_s , sensitivitas analitis bervariasi dengan konsentrasi.

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi terendah atau berat analit yang dapat diukur pada tingkat kepercayaan tertentu. Jadi, di dekat batas deteksi, sinyal yang dihasilkan mendekati yang dari kosong. Batas deteksi sering didefinisikan sebagai konsentrasi di mana rasio sinyal terhadap derau (*signal to noise ratio, S/N ratio*) mencapai nilai yang diterima (biasanya, antara 2 dan 4). Oleh karena itu, sinyal yang dapat dibedakan terkecil, S_m , adalah

$$S_m = X_{t,bl} + ks_{t,bl} \quad (1.9)$$

dimana, $X_{t,bl}$ dan $s_{t,bl}$ adalah sinyal referensi rata-rata dan standar deviasinya. Konstanta k bergantung pada tingkat keyakinan, dan nilai yang diterima adalah 3 pada tingkat kepercayaan 89%. Batas deteksi dapat ditentukan secara eksperimental dengan menjalankan beberapa sampel referensi untuk menetapkan rata-rata dan standar deviasi referensi. Substitusi persamaan (1.7) menjadi (1.9) dan menata ulang kembali menjadi:

$$C_m = \frac{S_m - s_{t,bl}}{m} \quad (1.10)$$

di mana C_m adalah konsentrasi terdeteksi minimum dan s_m adalah sinyal yang diperoleh pada konsentrasi tersebut. Jika pemulihan dalam langkah persiapan sampel diperhitungkan, batas deteksi diberikan sebagai:

$$C_m = \frac{s_m - s_{t,bl}}{mr} \quad (1.11)$$

Sekali lagi, pemulihan yang rendah akan meningkatkan batas deteksi, dan teknik persiapan sampel harus diarahkan pada pemulihan 100%.

Tingkat konsentrasi terendah di mana pengukuran secara kuantitatif berarti disebut batas kuantisasi (*limit of quantitation*, LOQ). LOQ paling sering didefinisikan sebagai 10 kali rasio sinyal terhadap derau. Jika derau diperkirakan sebagai standar deviasi dari referensi, LOQ adalah ($10 \times s_{t,bl}$). Sekali lagi, ketika pemulihan langkah persiapan sampel diperhitungkan, maka LOQ keseluruhan metode meningkat sebesar $1/r$.

Untuk semua tujuan praktis, batas atas kuantisasi adalah titik di mana kurva kalibrasi menjadi non-linier. Titik ini disebut batas linearitas (*limit of linearity*, LOL). Ini dapat dilihat dari kurva kalibrasi yang disajikan pada Gambar 2. Metode analisis diharapkan memiliki rentang dinamis linier (*linear dynamic range*, LDR) minimal dua kali lipat, meskipun rentang yang lebih pendek juga dapat diterima. Mempertimbangkan semua ini, pemulihan dalam metode persiapan sampel merupakan parameter penting yang mencerminkan masalah kuantitatif seperti batas deteksi, sensitivitas, LOQ, dan bahkan LOL.

Sebelum metode analisis baru atau teknik persiapan sampel harus dilaksanakan, maka proses validasi adalah keharusan. Berbagai parameter perlu ditentukan selama proses validasi. Kesalahan acak dan sistematis diukur dalam hal presisi dan bias. Batas deteksi ditetapkan untuk setiap analit. Keakuratan dan ketepatan ditentukan pada rentang konsentrasi di mana metode ini akan digunakan. Rentang dinamis linier ditetapkan dan sensitivitas kalibrasi diukur. Secara umum, validasi metode memberikan gambaran komprehensif tentang manfaat metode baru dan memberikan dasar perbandingan dengan metode yang ada. Proses validasi tipikal melibatkan satu atau beberapa langkah berikut:

- *Penentuan operator tunggal dari parameter.* Akurasi, presisi, batas deteksi, rentang dinamis linier, dan sensitivitas harus ditentukan. Analisis dilakukan pada konsentrasi yang berbeda menggunakan standar.
- *Analisis sampel yang tidak diketahui.* Langkah ini melibatkan analisis sampel yang konsentrasinya tidak diketahui. Pengukuran kualitatif dan kuantitatif harus dilakukan. Sampel tidak dikenal yang dapat diandalkan diperoleh dari sumber komersial atau lembaga pemerintah sebagai bahan referensi bersertifikat. Keakuratan dan ketepatan harus ditentukan.
- *Pengujian kesetaraan.* Setelah metode tersebut dikembangkan, maka harus dibandingkan dengan metode serupa yang ada. Tes statistik digunakan untuk menentukan apakah metode baru dan yang telah ditetapkan memberikan hasil yang setara.
- *Tes kolaboratif.* Setelah metode telah divalidasi dalam satu laboratorium, maka dapat dilakukan pengujian kolaboratif. Di sini, sampel akan diuji dengan prosedur analisis yang identik dan dilakukan di beberapa laboratorium. Hasilnya dianalisis secara statistik untuk menentukan variabilitas bias dan variabilitas antar laboratorium. Langkah ini menentukan *ruggedness* dari metode tersebut.

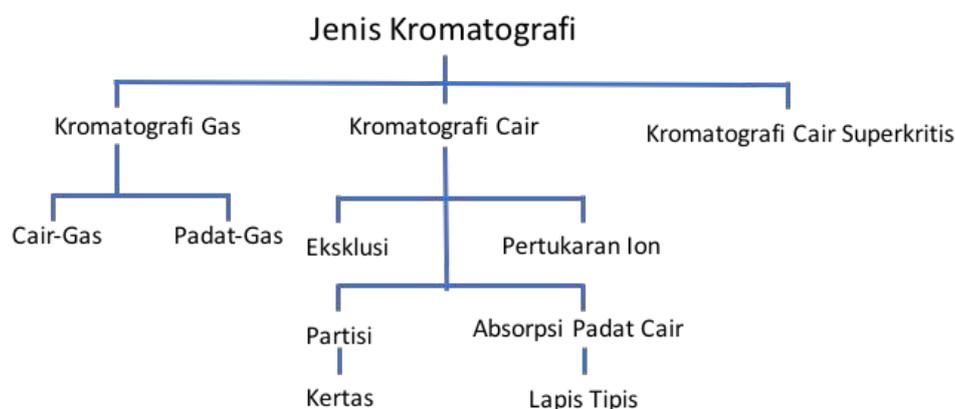
Soal-soal pertanyaan

1. Sebutkan tahapan yang digunakan secara umum oleh seorang analis dalam melakukan analisa!
2. Mengapa seorang analis perlu mendefinisikan permasalahan sebelum melakukan analisa?
3. Apakah yang dimaksud dengan matriks dalam sampel?
4. Parameter apa saja yang perlu dipertimbangkan oleh seorang analis saat melakukan pengukuran?
5. Bagaimana seorang analis menghindari bias dalam pengukuran menggunakan suatu instrumen analisa?

6. Dalam melakukan pengukuran menggunakan suatu instrumen analisa, bagaimana seorang analis memastikan bahwa rasio sinyal terhadap derau (*noise*) mencapai nilai yang dapat diterima?
7. Gambarlah diagram alur yang sistematis dari proses analisa suatu sampel yang tidak diketahui dengan mempertimbangkan parameter-parameter sehingga data yang dihasilkan patut!

BAB 2 Dasar separasi analitik dengan kromatografi

Seorang analis memiliki beberapa peralatan seperti kromatografi untuk mengukur analit yang berbeda dalam sampel yang kompleks. Kekuatan kromatografi berasal dari kemampuannya untuk memisahkan campuran senyawa yang akan dianalisa, atau "analit", serta menentukan identitas masing-masing (struktur kimia) dan konsentrasinya. Kromatografi dapat dibagi menjadi tiga tipe dasar yang meliputi kromatografi gas, cairan, dan superkritis. Kromatografi cair selanjutnya dapat dibagi menjadi pertukaran ion, pemisahan berdasarkan ukuran, dan bahkan diperluas ke teknik elektroforesis berbasis gel. Bab ini akan memberikan pengenalan dasar untuk berbagai kromatografi, khususnya cair yang paling sering digunakan dalam separasi pigmen fotosintesis dan beberapa senyawa lainnya. Hubungan antara masing-masing jenis kromatografi diilustrasikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kategori kromatografi dan hubungannya satu dengan lain menurut Dunnivant dan Ginsbach.

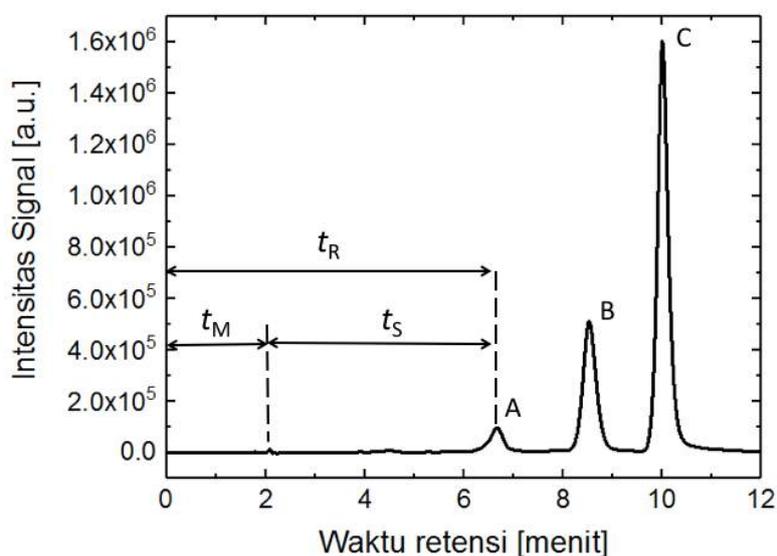
Secara umum, setiap jenis kromatografi terdiri dari dua langkah yang berbeda yaitu kromatografi (atau pemisahan senyawa individu dalam pita elusi yang berbeda) dan identifikasi (deteksi setiap pita elusi). Pada metode kromatografi cair pemisahan terjadi dalam fase cair. Setiap pita atau puncak yang keluar dari kolom dan identifikasi terjadi oleh detektor yang relatif universal. Salah satu detektor yang sangat umum untuk kromatografi cair adalah detektor UV-VIS yang mendeteksi spektrum absorpsi dari analit. Detektor yang umum lainnya misalnya adalah spektrometri massa (MS) yang mengubah setiap analit dari spesies netral secara kimia menjadi kation positif, biasanya memecah berbagai ikatan dalam proses. Pendeteksian massa potongan individu (disebut sebagai fragmen) tersebut memungkinkan untuk identifikasi secara konklusif dari struktur kimia analit.

Teori kromatografi

Semua sistem kromatografi memiliki fase gerak yang mengangkut analit melalui kolom dan fase diam yang berupa resin di dalam kolom. Fasa diam secara berinteraksi dengan masing-masing analit berdasarkan struktur kimianya, menghasilkan pemisahan masing-masing analit sebagai fungsi waktu yang dihabiskan dalam kolom pemisahan. Semakin sedikit analit berinteraksi dengan fase diam, semakin cepat mereka diangkut melalui sistem oleh fase gerak. Demikian sebaliknya terjadi pada analit yang berinteraksi lebih kuat. Dengan demikian, banyak analit dalam sampel diidentifikasi oleh waktu retensi (atau waktuambat) dalam sistem untuk satu set kondisi tertentu. Dalam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, tekanan fase gerak (cair), laju aliran, laju linier, dan polaritas fase gerak, semuanya, mempengaruhi waktu retensi senyawa. Ilustrasi waktu retensi ditunjukkan pada Gambar 5. Persamaan di bagian atas gambar akan dibahas nanti.



Gambar 4. Pemisahan ekstrak pigmen fotosintesis yang terjadi pada kromatografi kolom. Tampak pita-pita berwarna terpisah akibat interaksi dengan resin pada kolom



Gambar 5. Diagram plot kromatogram yang menunjukkan analisa identifikasi senyawa A, B dan C berdasarkan waktu retensi dan luas pita.

Diagram plot pada gambar 5 dinamakan **kromatogram** sangat penting untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Posisi pita pada sumbu x menunjukkan waktu retensi dalam satuan menit yang digunakan untuk mengidentifikasi secara kualitatif komponen dalam sampel, sedangkan luas area pita memberikan data pengukuran kuantitatif dari jumlah setiap komponen yang terdeteksi. Dalam gambar 5 ditunjukkan adanya pemisahan yang baik dari tiga pita yaitu A, B dan C yang merepresentasikan komponen yang terpisah dan teridentifikasi dengan baik. Kita akan membahas lebih detail dibawah untuk memahami informasi yang diberikan pada gambar 5 tersebut.

Konstanta distribusi

Efektivitas dari kolom kromatografi dalam memisahkan dua komponen bergantung salah satunya pada laju elusi relatif dari kedua komponen tersebut. Laju tersebut dapat dideterminasi dari rasio konsentrasi komponen pada setiap fasenya. Semua pemisahan berbasis kromatografi adalah berdasarkan perbedaan interaksi yang terjadi pada komponen yang terdistribusi antara fase gerak dan fase diam (stasioner). Untuk komponen A, maka kesetimbangan dapat diekspresikan dengan rumus:

$$A(\text{fase gerak}) \rightleftharpoons A(\text{fase diam}) \quad (2.1)$$

Konstanta kesetimbangan K_c untuk reaksi tersebut dinamakan **konstanta distribusi**, yang didefinisikan sebagai berikut,

$$K_c = \frac{(a_A)_S}{(a_A)_M} \quad (2.1)$$

dimana $(a_A)_S$ merupakan aktifitas komponen A dalam fase stasioner (fase diam) dan $(a_A)_M$ adalah aktivitas komponen A dalam fase gerak (*mobile phase*). Seringkali kita mensubstitusikan c_S , konsentrasi molar dari komponen dalam fase stasioner, dengan $(a_A)_S$, dan c_M untuk konsentrasi molarnya dalam fase gerak, $(a_A)_M$. Dengan demikian, kita dapat dengan lebih singkat menuliskan rumus diatas menjadi:

$$K_c = \frac{c_S}{c_M} \quad (2.2)$$

Secara ideal, konstanta distribusi adalah konstan untuk semua konsentrasi komponen, sehingga c_S proporsional langsung terhadap c_M .

Waktu retensi

Kalau kita perhatikan kembali gambar 5, kita melihat pita kecil paling kiri pada waktu retensi 2 menit. Pita kecil tersebut adalah spesies yang tidak diperoleh oleh fase diam. Waktu yang ditunjukkan dengan symbol t_M dinamakan **waktu hampa** atau **waktu mati** (*void time* atau *dead time*) yaitu waktu antara injeksi sampel dan kenampakan pita kecil ini. Dengan kata lain waktu hampa memberikan informasi besaran laju rata-rata migrasi dari fase gerak dan merupakan parameter yang penting dalam mengidentifikasi pita-pita analit. Sedangkan waktu yang dibutuhkan oleh komponen A terdeteksi oleh detektor setelah injeksi sampel dinamakan **waktu retensi** yang direpresentasikan dengan symbol t_R . Analit yang didapatkan karena telah melewati waktu t_S dalam fase stasioner. Dengan demikian waktu retensi dapat dipahami dengan rumus:

$$t_R = t_S + t_M \quad (2.4)$$

Laju linear rata-rata dari migrasi komponen, \bar{v} (biasanya dalam cm/detik), adalah sebagai berikut dibawah, dimana L merupakan panjang dari kolom yang digunakan.

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad (2.5)$$

Sedangkan laju linear rata-rata dari molekul fase gerak adalah

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (2.6)$$

Hubungan antara laju migrasi dan konstanta distribusi

Untuk mengkorelasikan antara laju migrasi dari komponen dan konstanta distribusinya, maka kita mengekspresikan laju sebagai fraksi dari laju fase gerak:

$$\bar{v} = u \times \text{fraksi waktu dari komponen yang dihabiskan dalam fase gerak}$$

Fraksi tersebut merupakan jumlah rata-rata mol komponen dalam fase gerak dibagi dengan jumlah total mol komponen dalam kolom:

$$\bar{v} = u \times \frac{\text{mol komponen dalam fase gerak}}{\text{mol total komponen}} \quad (2.7)$$

Jumlah mol total komponen dalam fase gerak adalah sama dengan konsentrasi molar, c_M , dari komponen pada fase tersebut dikalikan dengan volumenya, V_M . Sehingga didapatkan:

$$\bar{v} = u \times \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + c_S V_S / c_M V_M} \quad (2.8)$$

Dengan memasukan konstanta distribusi (persamaan 2.2), maka kita mendapatkan ekspresi dibawah ini,

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + K_c V_S / V_M} \quad (2.9)$$

dengan demikian kita telah mendapatkan korelasi antara laju migrasi dan konstanta distribusi.

Faktor retensi, K

Faktor retensi merupakan parameter yang sangat penting untuk menganalisa dan membandingkan laju migrasi komponen melalui kolom. Dengan demikian seorang analis dapat membandingkan kolom satu dengan kolom yang lain dengan lebih tepat. Untuk komponen A, maka faktor retensi k_A didefinisikan sebagai berikut:

$$k_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad (2.10)$$

dimana K_A adalah konstanta distribusi dari komponen A. Dengan melakukan substitusi persamaan 2.10 dengan 2.9, serta mempertimbangkan laju linear migrasi komponen (persamaan 2.5) dan laju linear rata-rata dari fase gerak (persamaan 2.6), maka persamaan faktor retensi dapat disederhanakan menjadi:

$$k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_S}{t_M} \quad (2.11)$$

Dengan demikian faktor retensi, k_A , untuk komponen A berelasi dengan laju dimana A bermigrasi melewati kolom, dan dapat dihitung berdasarkan data kromatogram seperti gambar 4 diatas.

Faktor Selektivitas

Faktor selektivitas untuk dua komponen A dan B dalam kolom memberikan informasi terkait seberapa baik kolom akan memisahkan kedua komponen tersebut. Oleh sebab itu faktor selektivitas dari komponen A dan B dapat didefinisikan sebagai berikut:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k_B}{k_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (2.12)$$

dimana K_B adalah konstanta distribusi dari komponen B dan K_A adalah konstanta distribusi dari komponen A. Apabila disubstitusi dengan persamaan 2.10 akan didapatkan hubungan antara faktor selektivitas untuk kedua komponen tersebut dengan faktor retensinya. Sedangkan apabila disubstitusi dengan persamaan 2.11, maka akan dihasilkan persamaan bahwa faktor selektivitas dapat dihitung dari data waktu retensi dan waktu hampa pada kromatogram.

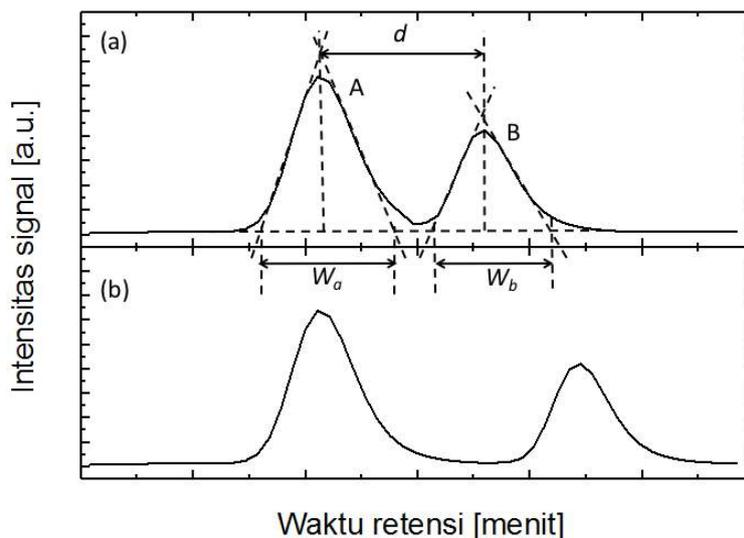
Resolusi kolom

Resolusi kolom (R_S) merupakan dasar kuantitatif dimana dua pita terpisah satu dengan yang lainnya dalam jarak (d) relatif terhadap lebar pita. Secara jelas pengertian dari resolusi kolom ini dapat diilustrasikan pada gambar 5 yang menunjukkan kromatogram pemisahan komponen A dan B. Secara persamaan, maka resolusi kolom dapat didefinisikan sebagai berikut:

$$R_S = \frac{2d}{W_a + W_b} = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_a + W_b} \quad (2.13)$$

dimana d merupakan jarak antara puncak pita A dan B, atau dapat dihitung dengan data waktu retensi puncak A dan B. Sedangkan lebar pita (W) dapat dihitung seperti yang diilustrasikan pada gambar 6.

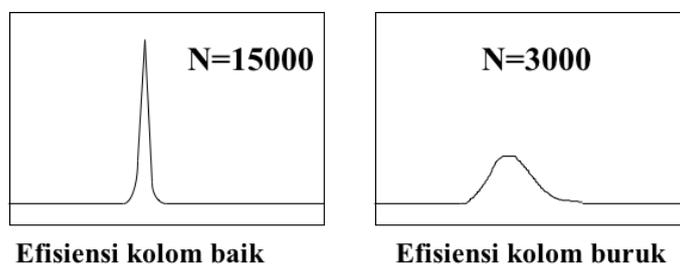
Resolusi juga merupakan suatu ukuran efisiensi kolom. Parameter lain yang digunakan untuk menghitung efisiensi kolom adalah jumlah pelat teoritis (*number of theoretical plates, N*). Jumlah pelat teoritis (N) dan tinggi pelat atau jarak setara dengan pelat teoritis (*height equivalent to a theoretical plate, H*) digunakan resmi dalam literatur dan oleh perusahaan pembuat kolom selalu dicantumkan dalam informasi spesifikasi kolom sebagai informasi yang menunjukkan ukuran performansi kolom tersebut.



Gambar 6. Pita-pita komponen A dan B yang terpisah dengan baik dan parameter untuk determinasi resolusi (R_S). Tampak jelas resolusi pemisahan pita A dan B pada kromatogram (b) lebih tinggi dibanding pemisahan pada kromatogram (a).

Jumlah pelat teoritis (N) dapat dideterminasi dari data kromatogram, tepatnya dari data waktu retensi dari suatu pita (t_R) dan lebar pita tersebut (W) yang dicatat, dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (2.14)$$



Gambar 7. Jumlah pelat teoritis menunjukkan efisiensi kolom sehingga dapat membedakan antara kolom yang baik dan kolom yang buruk. Informasi jumlah pelat teoritis dapat diketahui dari lembar spesifikasi kolom yang dikeluarkan oleh pabrikannya.

Pelat dapat dibayangkan sebagai suatu jarak sepanjang kolom dimana terdapat kesetimbangan penuh dari sampel diantara dua fase yang ada. Semakin tinggi jumlah pelat dari suatu kolom dengan panjang tertentu artinya semakin pendek tinggi pelat (H), dan semakin efisien kolom bekerja. Jarak melalui

kolom yang dideskripsikan sebagai tinggi, karena sejak awal penemuan kolom kromatografi, kolom tersebut kebanyakan dipasang secara vertikal:

$$H = \frac{L}{N} \quad (2.15)$$

dimana L adalah panjang dari kolom.

Persamaan yang telah merelasikan antara resolusi kolom dan jumlah pelat, serta faktor retensi dan faktor selektivitas dari sepasang komponen (A dan B) pada kolom dapat diekspresikan sebagai berikut:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1+k_B} \right) \quad (2.16)$$

dimana k_B adalah faktor retensi dari spesies yang bergerak paling lambat dan α adalah faktor selektivitas.

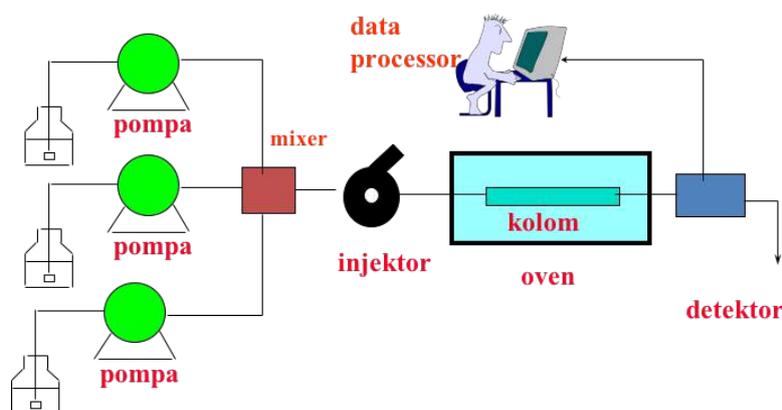
Kromatografi cair kinerja tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau *high-performance liquid chromatography (HPLC)* merupakan metode kromatografi elusi cair yang paling banyak digunakan pada bidang yang luas. Teknik ini digunakan oleh kimiawan untuk memisahkan dan mendeterminasi senyawa baik organik, anorganik dan material biologis. KCKT menggunakan teknik kromatografi cair, sehingga fase gerak yang digunakan adalah pelarut cair. Sedangkan fase diam bersifat padat, berpori, material aktif permukaan dalam bentuk partikel kecil atau pendukung padat yang dilapisi lapisan tipis cairan. Tipe-tipe KCKT biasanya diklasifikasikan berdasarkan mekanisme separasi atau jenis fase stasioner yang digunakan. Tipe-tipenya antara lain

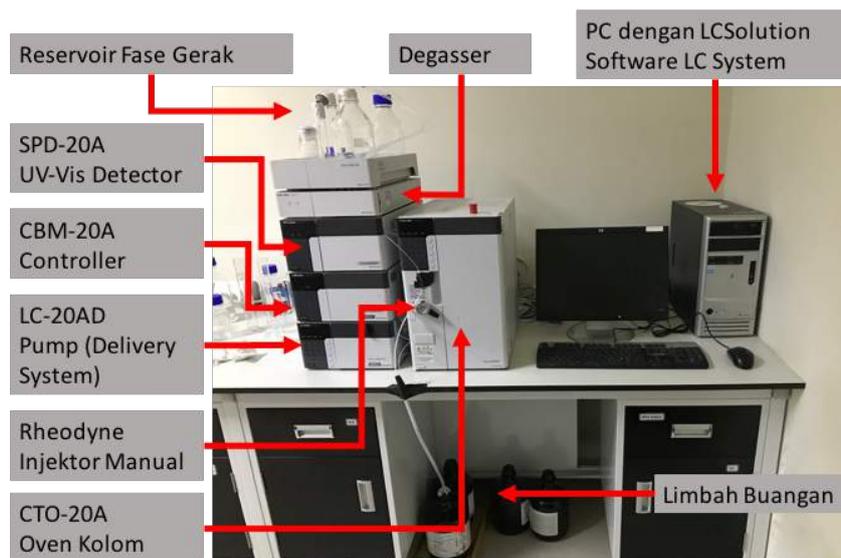
1. kromatografi partisi,
2. kromatografi adsorpsi,
3. kromatografi pertukaran ion,
4. kromatografi eksklusi ukuran (*size-exclusion*),
5. kromatografi afinitas, dan
6. kromatografi kiral.

Instrumentasi dalam KCKT

Metode isokratik dan metode gradien (*low pressure* dan *high pressure*) merupakan metode elusi kromatografi cair yang sering digunakan pada KCKT. Metode isokratik pada umumnya menggunakan jenis dan rasio pelarut yang sama, sedangkan metode gradien jenis dan rasio pelarut bisa diatur selama proses analisa. Berikut adalah skema instrumentasi dari tipe elusi gradien *high-pressure* (Gambar 8) dan sistem HPLC yang digunakan mahasiswa S1 kimia Universitas Ma Chung beserta daftar bagian dari KCKT beserta fungsi dan tipenya masing-masing (Tabel 3).



Gambar 8. Skema diagram blok instrumentasi KCKT tipe *high-pressure*



Gambar 9. Sistem KCKT analitik dari Shimadzu yang terdapat di laboratorium MRCPP yang digunakan oleh mahasiswa sarjana strata-1, Program Studi Kimia, Universitas Ma Chung.

Tabel 3. Bagian KCKT beserta fungsi yang didasarkan pada setup dari produk Shimadzu yang digunakan di laboratorium MRCPP oleh mahasiswa sarjana strata-1, Program Studi Kimia, Universitas Ma Chung.

No	Bagian KCKT	Fungsi	Tipe
1	Pengontrol sistem	Untuk menghubungkan antara bagian KCKT dan komputer	CBM-20Alite; CBM-20A
2	Tempat pelarut	Untuk menampung pelarut tunggal atau pelarut campuran	-
3	Degasser	Untuk menghilangkan gelembung udara yang terjadi saat dua jenis pelarut bercampur (misalnya etanol dan air)	DGU-20A3 (isokratik dan high pressure), DGU20A5 (low pressure)
4	Pencampur pelarut; <i>low pressure gradient valve</i>	Untuk mencampur pelarut sesuai dengan metode KCKT yang digunakan	-
5	Unit pengantar pelarut (pompa)	Untuk mengalirkan pelarut keseluruh bagian KCKT	LC-20AD (Isokratik), LC-20AB (high pressure), LC-20AT (low pressure)
6	Auto-sampler	Tempat sampel yang dilengkapi dengan pendingin dan untuk menginjek sampel secara otomatis	SIL-20AC
	Manual injector	Tempat untuk menginjek sampel menggunakan micro syringe	Rheodyne 7725
7	Oven kolom	Untuk menjaga suhu kolom dan mendukung analisa yang stabil	CTO-20AC
8	kolom	Kolom fase normal atau kolom fase terbalik	C8, C18, C30 (fase terbalik), silica (fase normal)

9	Detektor	Untuk mendeteksi senyawa yang sudah terpisahkan	SPD-20AV (UV-Vis Detector), SPD-M20A (PDA detector), MS
10	Computer + LC solution	Untuk pengoperasian KCKT	-
11	Pengkoleksi fraksi (tambahan)	Untuk mengoleksi fraksi yang sudah dipisahkan	FRC-10A
12	Keran penyeleksi arah alir (tambahan)	Untuk mengatur arah alir pelarut ke tempat pembuangan atau ke detector MS	FCV-20AH

Pompa

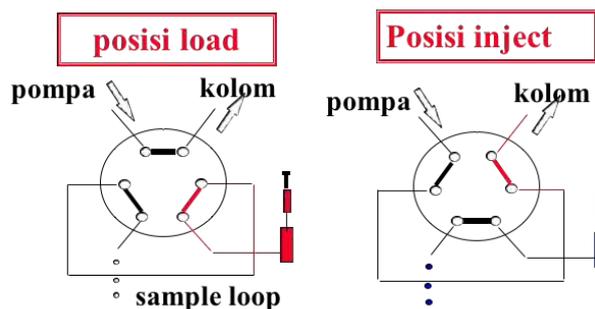
Dalam perkembangan KCKT, pompa adalah bagian terpenting dari sistem. Perkembangan teknologi KCKT dapat dikatakan seiring dengan perkembangan teknologi sistem pompa. Pompa diposisikan di aliran paling atas dari sistem kromatografi cair dan menghasilkan aliran eluen dari reservoir pelarut ke sistem. Pada tahap awal perkembangan kromatografi cair, untuk dapat menghasilkan tekanan tinggi adalah salah satu persyaratan sistem yang paling penting. Namun, saat ini, tekanan tinggi sudah merupakan persyaratan yang lazim dari KCKT yang standar, sehingga yang lebih diutamakan saat ini adalah mampu memberikan tekanan yang konsisten pada kondisi apa pun, menyediakan laju aliran yang dapat dikontrol dan konsiten, karena perubahan dalam laju aliran sangat mempengaruhi sebagian besar analisis. Kebanyakan pompa yang digunakan dalam sistem kromatografi cair saat ini menghasilkan aliran dengan gerakan maju dan mundur dari piston yang digerakkan motor (*reciprocating pump*). Karena gerakan piston tersebut, maka pompa menghasilkan "pulsa". Ada perbaikan sistem yang besar untuk mengurangi denyutan pulsa dan pompa baru-baru ini menciptakan lebih sedikit pulsa dibandingkan dengan yang generasi lama. Namun, analisis terbaru membutuhkan sensitivitas yang sangat tinggi untuk mengukur jumlah analit yang sedikit, dan bahkan sedikit perubahan dalam laju aliran dapat mempengaruhi analisis. Oleh karena itu, pompa yang diperlukan untuk analisis sensitivitas tinggi harus sangat tepat.



Gambar 10. Pompa KCKT dari Shimadzu seri LC-20AD

Injektor

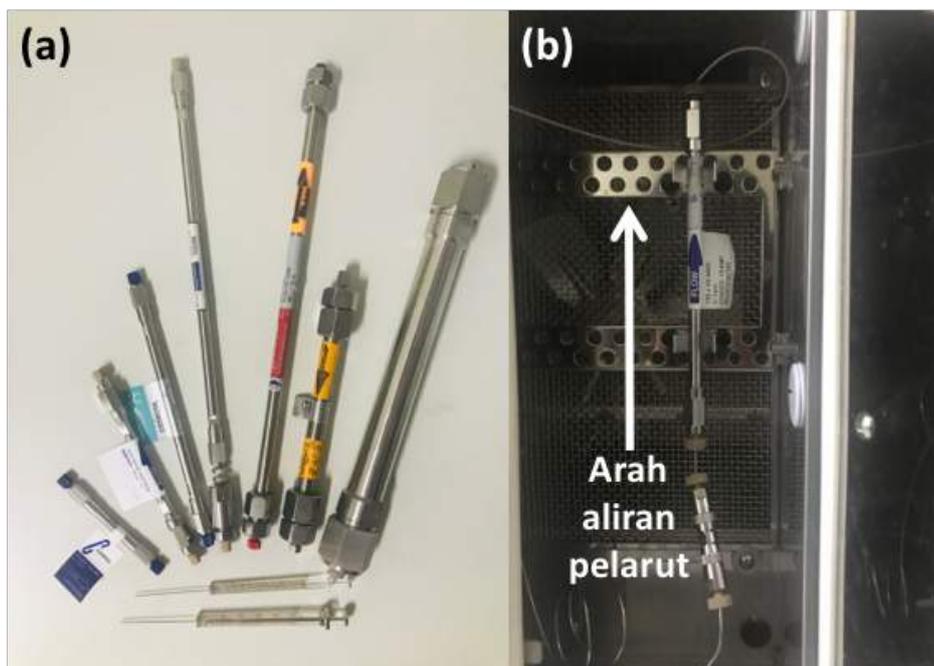
Sebuah injektor ditempatkan di sebelah pompa. Metode yang paling sederhana adalah dengan menggunakan jarum suntik, dan sampel dimasukkan dengan jarum suntik ke aliran fase gerak. Karena ketepatan pengukuran kromatografi cair sangat dipengaruhi oleh reproduibilitas injeksi sampel, desain injektor menjadi faktor penting. Metode injeksi yang paling banyak digunakan adalah berdasarkan *sampling loop*. Penggunaan sistem *autosampler* atau injektor otomatis juga digunakan secara luas yang memungkinkan injeksi berulang dalam satu set waktu yang dijadwalkan.



Gambar 11. Gambar skematis sistem injektor KCKT

Kolom

Pemisahan dilakukan di dalam kolom, oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa kolom adalah jantung dari sistem kromatografi cair. Teori kolom kromatografi belum berubah sejak masa Tswett, namun ada perbaikan terus-menerus dalam pengembangan kolom. Kolom baru-baru ini sering disiapkan dalam perumahan baja tahan karat, bukan kolom kaca yang digunakan dalam eksperimen Tswett. Bahan pengepakan yang umumnya digunakan adalah silika atau gel polimer dibandingkan dengan kalsium karbonat yang digunakan oleh Tswett. Eluen yang digunakan untuk kromatografi cair bervariasi dari pelarut asam hingga basa. Kebanyakan rumah kolom terbuat dari baja tahan karat, karena stainless tahan terhadap berbagai macam pelarut. Namun, untuk analisis beberapa analit seperti biomolekul dan senyawa ionik, kontak dengan logam tidak diinginkan, sehingga digunakan perumahan polieter eter keton (PEEK) kolom sebagai gantinya (lihat perumahan selang pada gambar 12(b) yang menghubungkan selang dengan kolom).



Gambar 12. (a) Berbagai jenis dan tipe kolom dan injektor yang digunakan oleh mahasiswa. (b) Pemasangan yang tepat dari kolom dengan memperhatikan arah aliran pelarut dan penempatan kolom penjaga (*guard column*) untuk mengamankan kolom dari kemungkinan pengotor yang masuk.

Detektor

Pemisahan analit dilakukan di dalam kolom, sedangkan detektor digunakan untuk mengamati pemisahan yang diperoleh. Komposisi eluen konsisten ketika tidak ada analit yang hadir. Sedangkan

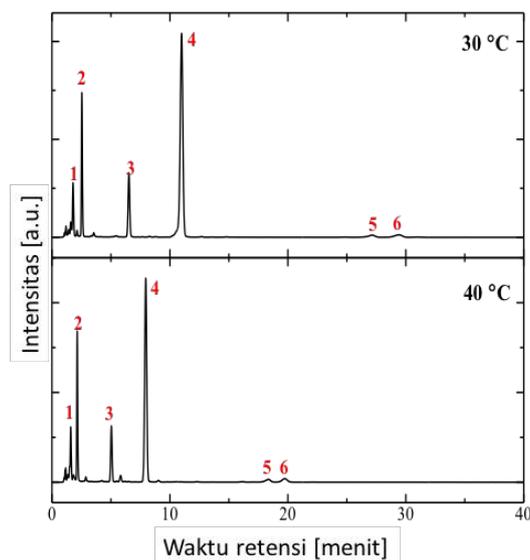
kehadiran analit mengubah komposisi eluen. Detektor apa yang dilakukan untuk mengukur perbedaan ini. Perbedaan ini dimonitor sebagai bentuk sinyal elektronik. Ada berbagai jenis detektor yang tersedia, diantaranya yang digunakan dalam laboratorium MRCPP, Universitas Ma Chung adalah detektor diode array (DAD) yang dapat mengukur spektrum absorpsi dari panjang gelombang 190 s.d. 800 nm, dan detektor spektrometer massa (MS/MS).

Degasser

Eluen yang digunakan untuk analisis kromatografi cair mungkin mengandung gas seperti oksigen yang tidak terlihat oleh mata kita. Ketika gas hadir dalam eluen, ini dideteksi sebagai kebisingan dan menyebabkan baseline tidak stabil. Metode yang umum digunakan meliputi penyemprotan (pengelembungan gas lembam), penggunaan aspirator, sistem distilasi, dan / atau pemanasan dan pengadukan. Namun, metode ini tidak nyaman dan juga ketika pelarut dibiarkan untuk jangka waktu tertentu (misalnya, selama analisis panjang), gas akan larut kembali secara bertahap. *Degasser* menggunakan membran membran polimer khusus untuk menghilangkan gas. Banyaknya pori-pori yang sangat kecil di permukaan tabung polimer memungkinkan udara masuk sambil mencegah cairan apa pun masuk melalui pori-pori. Dengan menempatkan tabung ini di bawah kontainer tekanan rendah, itu menciptakan perbedaan tekanan di dalam dan di luar tabung (lebih tinggi di dalam tabung). Perbedaan ini membiarkan gas terlarut bergerak melalui pori-pori dan mengeluarkan gas. Dibandingkan dengan degassing tipe batch klasik, *degasser* dapat digunakan secara on-line, lebih mudah dan efisien. Banyak sistem unit KCKT baru mengandung *degasser*.

Pemanas (oven) kolom

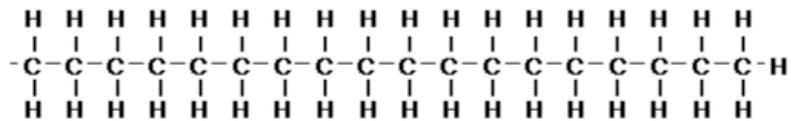
Pemisahan kromatografi cair sering sangat dipengaruhi oleh suhu kolom. Untuk mendapatkan hasil yang dapat diulang, penting untuk menjaga kondisi suhu yang konsisten. Juga untuk beberapa analisis, seperti gula dan asam organik, resolusi yang lebih baik dapat diperoleh pada suhu tinggi (50 hingga 80 °C). Hal ini juga penting untuk menjaga suhu stabil untuk mendapatkan hasil yang dapat diulang bahkan dianalisis di sekitar suhu kamar. Ada kemungkinan bahwa perbedaan suhu yang kecil menyebabkan hasil pemisahan yang berbeda (gambar 13). Jadi kolom umumnya disimpan di dalam oven kolom (pemanas kolom).



Gambar 13. Ilustrasi perbandingan efek penggunaan temperatur pemanas kolom yang berbeda saat pemisahan pigmen fotosintesis dari ekstrak daun suji (*Plectranthus amboinensis*). Pita-pita diberikan nomor secara berurutan adalah pigmen violaksantin, zeaksantin, klorofil a, klorofil b, alfa-karoten dan beta-karoten.

Kolom fase terbalik (*reverse-phase column*)

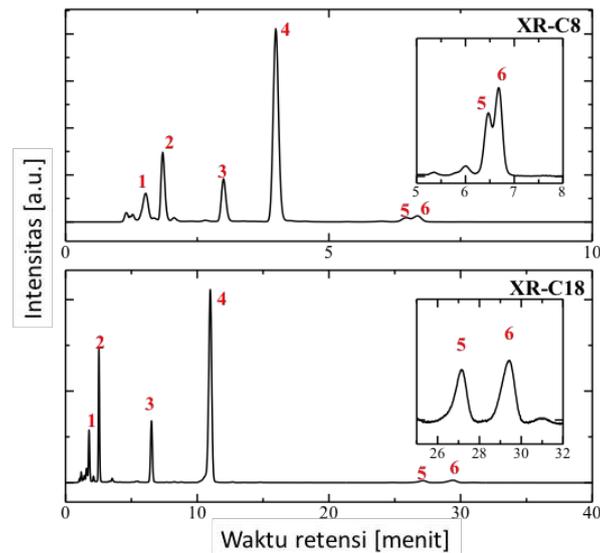
Kromatografi fase terbalik adalah teknik yang menggunakan rantai alkil yang berikatan kovalen dengan partikel fase stasioner untuk menciptakan fase diam hidrofobik, yang memiliki afinitas kuat untuk senyawa hidrofobik atau kurang polar. Penggunaan fase diam hidrofobik pada dasarnya adalah kebalikan dari kromatografi fase normal, karena polaritas fase bergerak dan stasioner telah terbalik - maka kromatografi fase pembalik fase. Kromatografi fase terbalik menggunakan fase gerak polar. Akibatnya, molekul hidrofobik dalam fase gerak polar cenderung menyerap ke fase diam hidrofobik, dan molekul hidrofilik dalam fase gerak akan melewati kolom dan dielusi terlebih dahulu. Molekul hidrofobik dapat dielusi dari kolom dengan mengurangi polaritas fase gerak menggunakan pelarut organik (non-polar), yang mengurangi interaksi hidrofobik. Semakin hidrofobik molekul, semakin kuat ia akan mengikat fase diam, dan semakin tinggi konsentrasi pelarut organik yang akan diperlukan untuk mengelusi molekul.



Gambar 14. Struktur molekul C18

Kelompok gugus fungsional yang paling sering digunakan adalah oktadesil. Kelompok fungsional oktadesil memiliki rantai karbon lurus 18. Jenis kolom ini juga sering disebut kolom C18 (C-delapan belas). Nama oktadesil berasal dari "okta" yang berarti angka 8 dan "desi" yang berarti nomor 10. Sejumlah besar rantai hidrokarbon ini melekat pada permukaan gel silika. Dengan melihat struktur yang tertulis di atas (gambar 13), mungkin terlihat seperti rantai yang sangat panjang, tetapi dibandingkan dengan ukuran silika gel, sebenarnya kecil. Dengan demikian, jumlah rantai yang tak terbatas dapat dimodifikasi pada satu silika gel. Lebih dari rantai ini dimodifikasi bahkan di dalam pori-pori silika-gel.

Sebagai ilustrasi, beberapa orang mungkin mengambil selebaran, tetapi yang lain mungkin tidak memperhatikan. Demikian pula, beberapa senyawa dapat "dihentikan" oleh kelompok fungsional tertentu, tetapi yang lain mungkin tidak. Ini mendefinisikan waktu elusi dari setiap komponen. Dengan menggunakan kata-kata yang lebih ilmiah, dapat dikatakan pemisahan adalah hasil dari afinitas yang berbeda antara gel dan komponen dalam sampel. Afinitas ini disebut "partisi" atau "adsorpsi" sehingga jenis pemisahan ini juga disebut kromatografi partisi atau adsorpsi, lebih tepatnya dinamakan mode fase terbalik adalah bagian dari mode partisi atau adsorpsi.



Gambar 15. Ilustrasi perbandingan penggunaan kolom yang berbeda (C8 dan C18) untuk memisahkan pigmen fotosintesis dari ekstrak daun suji (*Pleomele angustifolia*). Pita-pita diberikan nomor secara berurutan adalah pigmen violaksantin, zeaksantin, klorofil *a*, klorofil *b*, alfa-karoten dan beta-karoten.

Gel yang terbuat dari basa silika dan dimodifikasi dengan gugus fungsional oktadesil disebut gel *octadecyl silica* (ODS). Juga kolom yang dikemas dengan gel ODS disebut kolom ODS (atau disebut kolom C18). Di antara kolom berbasis silika yang tersedia di pasar, sekitar 80% dari mereka adalah kolom ODS. Idealnya, seluruh permukaan gel ODS dimodifikasi dengan gugus fungsi C18; Namun akan ada ruang tersisa yang tidak dimodifikasi. Bagian tersebut disebut "silanol sisa" dan keberadaan silanol sisa dapat mempengaruhi pemisahan. Seringkali "end capping" diterapkan pada gel untuk melumpuhkan sisa silanol. Hampir semua kolom ODS saat ini tertutup, namun tergantung pada jenis analit, kehadiran silanol dapat memberikan hasil pemisahan yang lebih baik.

ODS adalah kolom fase terbalik yang paling populer digunakan, namun karena C18 adalah rantai panjang, ia mungkin mempertahankan senyawa terlalu banyak dan akibatnya menghasilkan waktu analisis yang panjang. Jadi dalam kasus-kasus itu, lebih baik menggunakan kelompok fungsional dengan rantai yang lebih pendek, seperti C8 (oktil), C4 (butil), dan C3 (trimetil).

Kolom fase normal

Agak rumit untuk menjelaskan perbedaan teoritis rinci antara fase terbalik dan fase normal, sehingga kita akan tetap sederhana di sini sebagai pengantar. Gel dan fase gerak yang digunakan untuk analisis KCKT memiliki polaritas yang berbeda. Air dan minyak adalah contoh terkenal dari sesuatu yang tidak bercampur: Air dikategorikan sebagai sesuatu dengan polaritas tinggi sementara minyak dikategorikan sebagai sesuatu dengan polaritas rendah. Minyak adalah jenis karbohidrat, terbuat dari karbon dan hidrogen; senyawa tersebut memiliki polaritas rendah. Sebaliknya, air terbuat dari oksigen dan hidrogen; senyawa tersebut memiliki polaritas yang lebih tinggi. Silika gel tanpa dimodifikasi memiliki polaritas yang tinggi, tetapi ketika gugus fungsi C18 dimodifikasi, polaritasnya menjadi rendah. Mode fase terbalik menggunakan gel dengan polaritas rendah (misalnya, ODS) dan fasa gerak dengan polaritas tinggi (misalnya air atau asetonitril). Mode fase normal menggunakan gel dengan polaritas tinggi (misalnya silika) dan fasa gerak dengan polaritas rendah (misalnya heksana atau kloroform). Alih-alih menggunakan kata polaritas rendah atau tinggi, juga umum digunakan kata-kata, hidrofobik atau hidrofilik. Sesuatu yang mudah larut dalam air (yaitu, polaritas tinggi) disebut hidrofilik dan sesuatu yang mudah larut dalam minyak (yaitu, polaritas rendah) disebut hidrofobik.

Pada tahap awal pengembangan HPLC, silika gel tanpa gugus fungsional hanya digunakan. Dengan demikian, mode normal-fase historis dikembangkan pertama dan dinamakan "normal". Kemudian

mode pemisahan yang menggunakan teori pemisahan berlawanan dengan fase normal dikembangkan dan diberi nama "terbalik". Mode fase terbalik jauh lebih populer digunakan daripada fase normal saat ini, tetapi kita tidak dapat mengubah latar belakang historis, dan dengan demikian mereka masih disebut mode fase normal dan terbalik.

Kolom *Hydrophilic Interaction Chromatography* (HILIC)

HILIC adalah konsep yang relatif baru dalam kromatografi partisi. HILIC dianggap sebagai bagian dari fase normal karena polaritasnya yang tinggi pada permukaan gel. Bahan dasar dapat berupa silika atau polimer dan mereka dapat dimodifikasi dengan berbagai jenis fungsi polar seperti amida, amino, diol, dan siano. Namun dibandingkan dengan mode normal, fase gerak yang digunakan untuk HILIC sangat mirip dengan fase gerak fase terbalik seperti campuran air dan asetonitril. Dari sudut pandang praktis, HILIC berada di antara fase terbalik dan pemisahan fase normal. Senyawa hidrofilik yang "terlalu polar" untuk ditahan oleh fase terbalik dapat dianalisis oleh HILIC menggunakan fase gerak yang mirip dengan kondisi fase terbalik. Karena fitur ini HILIC populer digunakan untuk pemisahan karbohidrat, terutama sakarida yang hidrofilik. Kolom Shodex misalnya membawa kolom amino berbasis polimer, bernama seri Asahipak NH2P. NH₂ menunjukkan "gugus fungsi amino" dan P kembali merupakan polimer. Kolom ini diisi dengan gel berbahan dasar polivinil alkohol, dimodifikasi dengan poliamina. Sedangkan untuk kolom fase terbalik, basis polimer dibandingkan dengan kolom basa silika akan memberikan umur kolom yang lebih lama, daya tahan dalam kondisi alkalin, dan pengulangan yang baik.

Soal-soal pertanyaan

1. Data apakah yang didapatkan dari suatu diagram plot kromatogram?
2. Bagaimana seorang analis dapat mengetahui resolusi pemisahan komponen dalam sampel? Jelaskan
3. Bagaimana seorang analis melakukan cek terhadap efisiensi kolom dalam memisahkan komponen?
4. Apakah perbedaan metode isokratik dan metode gradien dalam kromatografi cair?
5. Mengapa diperlukan *degasser* dalam sistem kromatografi padahal sebelumnya pelarut fase gerak telah terlebih dulu dihilangkan gelembung gas dengan sonikasi?
6. Berikan penjelasan logis mengapa seorang analitis memutuskan untuk memilih suatu jenis kolom, misalnya kolom fase terbalik dibandingkan kolom fase normal!

BAB 3 Kromatografi Cair-Spektrometri Massa

Saat ini kromatografi cair yang terkoneksi langsung dengan detektor spektrometri massa (LC-MS) menjadi metode rutin dalam berbagai bidang, seperti farmasi, lingkungan, makanan, dan bahan industri. Oleh sebab itu penting sangat penting pengenalan teori dan latihan praktis keterampilan untuk menguasai alat LC-MS menjadi sangat penting.

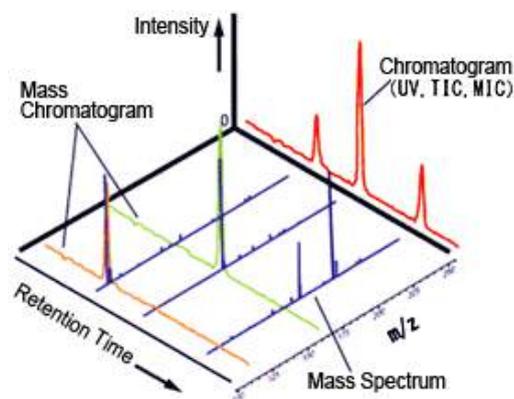
Sebagaimana telah dijelaskan pada bab sebelumnya, kromatografi cair (LC) memisahkan komponen sampel berdasarkan perbedaan afinitas (atau kekuatan retensi) dari fasa stasioner atau fasa gerak, kemudian mendeteksi komponen yang terpisah menggunakan UV, fluoresensi, atau konduktivitas listrik berdasarkan sifat-sifatnya. Detektor-detektor tersebut mendeteksi senyawa berdasarkan waktu retensi dan jumlah senyawa berdasarkan intensitas puncak dan daerah puncak yang muncul seiring dengan waktu retensi. Kromatografi cair menawarkan solusi yang baik untuk optimasi resolusi pemisahan, tetapi apabila senyawa-senyawa yang dianalisa secara kualitatif dan kuantitatif secara akurat ternyata terelusi pada waktu retensi yang kurang lebih sama, seperti kasus multianalit simultan, maka kita akan menghadapi kesulitan.



Gambar 16. KCKT yang terkoneksi dengan spektroskopi massa (HPLC-ESI-MS/MS) dengan tipe LCMS-8030 dari Shimadzu yang digunakan mahasiswa Program Studi Kimia, Universitas Ma Chung, Malang.

Sebaliknya, spektrometri massa (MS) menawarkan teknik deteksi yang sangat sensitif yang mengionisasi komponen sampel menggunakan berbagai metode, kemudian memisahkan ion yang dihasilkan dalam ruang hampa berdasarkan rasio massa-ke-muatan dan mengukur intensitas masing-masing ion. Karena spektrum massa yang disediakan oleh MS dapat menunjukkan tingkat konsentrasi ion yang memiliki massa tertentu, maka informasi ini sangat membantu untuk analisis kualitatif. Hal ini disebabkan karena massa adalah informasi khusus untuk molekul tertentu dan MS memungkinkan memperoleh informasi itu secara langsung. Namun, perlu dicatat bahwa hal ini hanya berlaku ketika mengukur komponen tunggal. Jika beberapa komponen disuntikkan secara bersamaan, menjadi sangat sulit untuk menganalisis spektrum.

Oleh karena itu, sistem LC-MS menggabungkan resolusi pemisahan senyawa dengan kromatografi cair yang luar biasa dengan kemampuan kualitatif spektrometri massa yang luar biasa. Spektrum massa yang diperoleh dari pengukuran pemindaian ini memberikan informasi massa molekul dan struktur untuk komponen terelusi, yang melengkapi informasi kualitatif berdasarkan waktu retensi yang diperoleh dengan menggunakan detektor LC lain (Gambar 17).



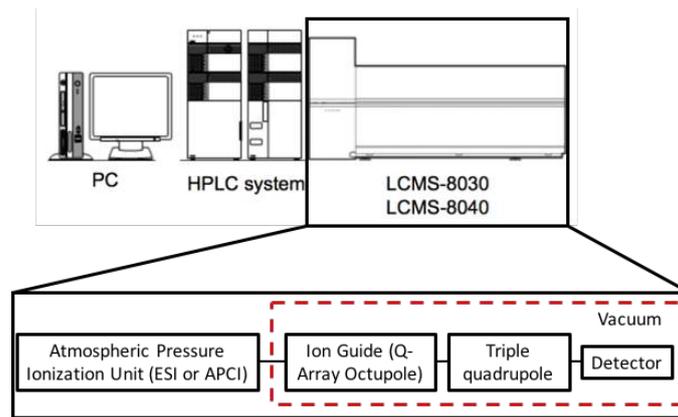
Gambar 17. Ilustrasi data yang dihasilkan berupa kromatogram dan spektrum MS

Dalam teknik analisa spektrometri massa, dikenal pula pengukuran pemantauan ion terpilih, SIM (*selected ion monitoring*) yaitu teknik untuk mendeteksi substansi target yang dipilih berdasarkan massa ion, yang merupakan parameter yang sangat selektif. Metode ini memungkinkan analisis kuantitatif yang menghindari efek pengotor bahkan ketika pemisahan dengan LC tidak memadai. Dengan kata lain jika kita memiliki lima senyawa target, maka kita dapat menginputkan informasi massa ion ke-5 senyawa target tersebut, dan secara otomatis mesin spektrometri massa akan hanya memantau ke-5 senyawa target tersebut secara khusus. Dalam hal ini, spektrometri massa memberikan penerapan yang luas untuk berbagai senyawa dengan selektivitas tinggi dan selain itu spektrometer massa menawarkan hasil karakteristik senyawa yang sangat baik sebagai detektor pada kromatografi cair.

Komponen-komponen dalam Sistem LC-MS

Komponen-komponen dalam sistem LC-MS antara lain sistem kromatografi cair yang antarmuka terkoneksi langsung dengan sistem spektrometri massa, sehingga sampel dapat terhubung dengan unit sumber ion yang mengionisasi sampel, lensa elektrostatis yang secara efisien memfokuskan ion yang dihasilkan menuju unit analisa massa yang memisahkan ion berdasarkan rasio *mass-to-charge* (m/z) mereka, dan kemudian unit detektor yang mendeteksi ion-ion yang terpisah.

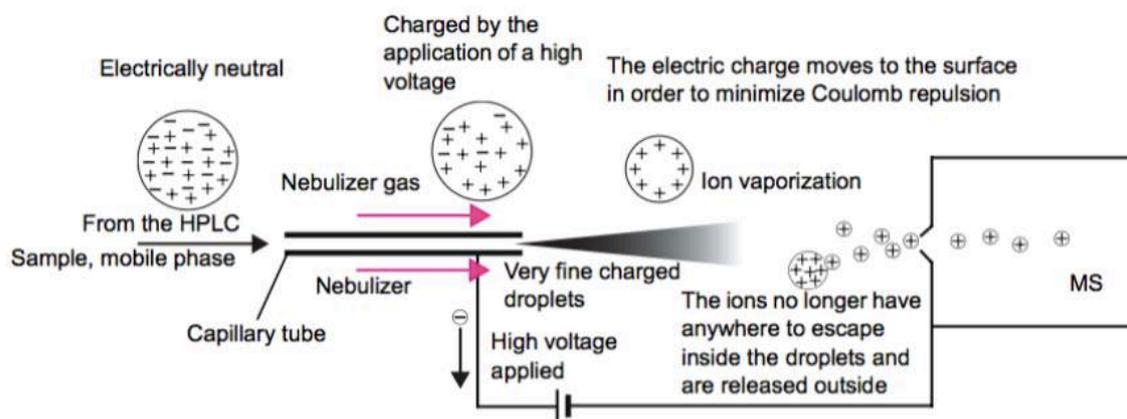
Variasi sistem spektrometri massa sebenarnya berfokus pada metode ionisasi. Contoh dibawah ini menunjukkan komponen dari sistem MS kuadrupol dengan unit ionisasi tekanan atmosfer, yang umum digunakan sebagai detektor LCMS (Gambar 18). Unit ionisasi tekanan atmosfer didasarkan pada sistem ionisasi elektropray (ESI), ionisasi kimia atmosfer (APCI), atau metode ionisasi lainnya, dan berfungsi sebagai sumber pengionisasi yang terkoneksi langsung antarmuka dengan sistem KCKT. Ion yang dihasilkan dalam unit ini dilucuti dari pelarut, kemudian difokuskan ke balok menggunakan oktopol atau cara lain, kemudian dikirim ke kuadrupol. Baik arus langsung dan frekuensi tinggi arus bolak-balik diterapkan ke kuadrupol, sehingga hanya ion dengan target m/z ratio berhasil melewati kuadrupol. Jumlah ion yang mencapai detektor diubah menjadi sinyal yang kemudian dicatat ke komputer.



Gambar 18. Skema komponen-komponen dalam sistem LC-MS (Shimadzu, 2010)

Sistem Ionisasi Tekanan Atmosfer

Ketika ionisasi tekanan atmosfer (*atmospheric pressure ionization*, API) muncul belum lama ini, koneksi antarmuka (*interface*) yang ditingkatkan teknologinya memungkinkan untuk memperoleh ion dengan cara yang dapat diandalkan. Seperti namanya, sistem API mengionisasi sampel di bawah kondisi tekanan atmosfer, yang membuatnya sangat berguna untuk menghilangkan pelarut di luar ruang hampa. Saat ini, ada dua jenis koneksi antarmuka API. Salah satunya adalah ionisasi elektropray (ESI), yang paling cocok untuk senyawa ionik dengan polaritas tinggi (Gambar 19).



Gambar 19. Sistem evaporasi dalam metode ionisasi elektropray (ESI) (Shimadzu, 2010)

ESI menarik solusi sampel ke ujung pipa kapiler, di mana ia menerapkan tegangan tinggi sekitar 3 hingga 5 kV. Gas nebulizer mengalir dari luar kapiler untuk menyemprotkan sampel (Gambar 19). Hasil semprotan tersebut menciptakan kabut halus tetesan sampel bermuatan dengan polaritas yang sama dengan tegangan yang diterapkan. Saat partikel bermuatan ini bergerak, pelarut terus menguap, sehingga meningkatkan medan listrik pada permukaan tetesan. Ketika gaya saling tolak dari muatan melebihi tegangan permukaan cair, maka terjadi fisis. Diperkirakan bahwa karena siklus penguapan dan fisis ini diulang, tetesan akhirnya menjadi cukup kecil sedemikian sehingga ion sampel dilepaskan ke fase gas (model penguapan ion).

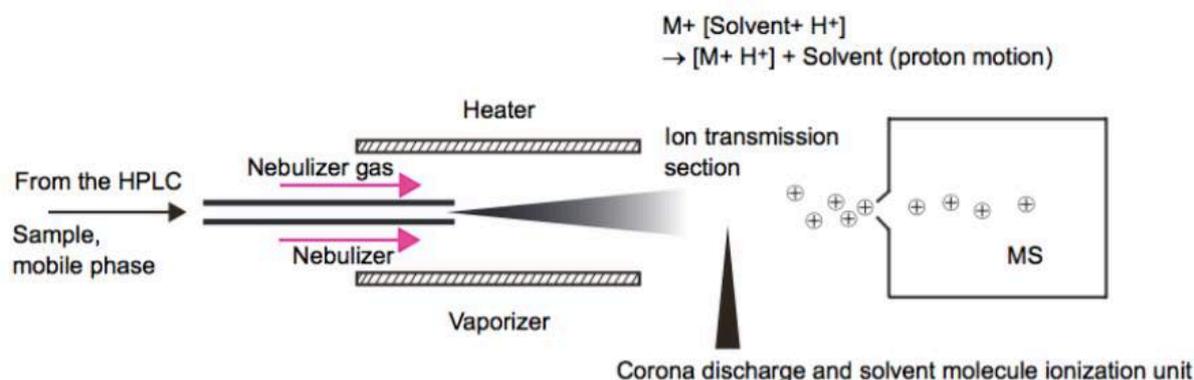
Prinsip-prinsip ionisasi dengan ESI:

1. Larutan sampel ditarik ke dalam tabung kapiler dengan tegangan tinggi sekitar 3 sampai 5 kV yang diterapkan padanya.
2. Gas nebulizer diledakkan di bagian luar tabung kapiler, menyemprotkan larutan dan menghasilkan tetesan halus yang terisi elektrostatis dengan tanda yang sama dengan tegangan yang diberikan.

3. Selama pergerakan, tetesan yang bermuatan dikenakan penguapan pelarut, dan mereka hancur ketika gaya tolak di antara muatan melebihi tegangan permukaan cairan.
4. Melalui pengulangan penguapan dan disintegrasi, tetesan yang sangat halus tercapai, dan pada akhirnya diperkirakan bahwa ion sampel dilepaskan dalam fase uap. Keadaan ini disebut penguapan ion.

ESI dikenal sebagai metode ionisasi terlembut yang tersedia, yang berarti dapat digunakan untuk senyawa yang sangat polar, senyawa yang paling tidak stabil, atau senyawa tidak stabil terhadap panas. Karena sebagian besar ion yang dihasilkan adalah molekul terprotonasi (atau molekul terdeprotonasi), maka ion fragmen yang rumit tidak dihasilkan. Hal ini membuat analisa lebih mudah untuk menentukan massa molekul senyawa. Selain itu, karena menghasilkan ion multivalen, tergantung pada senyawa, bahkan jika suatu senyawa memiliki massa molekul 10.000, misalnya, ion dengan valensi 20 hanya akan memiliki rasio m/z 501 dan ion dengan valensi 10 hanya akan memiliki rasio m/z 1001, yang dapat dideteksi menggunakan spektrometer massa kecil. Juga dimungkinkan untuk menggunakan pemrosesan komputer untuk memprediksi massa molekul dari ion multivalen tersebut. ESI digunakan untuk menganalisis berbagai sampel, seperti bahan alami, makromolekul biologis, dan obat-obatan.

Metode lainnya dari API adalah ionisasi kimia tekanan atmosfer (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*), yang merupakan jenis ionisasi kimia, mirip dengan ionisasi kimia (CI, *chemical ionization*) untuk GC-MS (Gambar 20). Meskipun desain antarmuka mirip dengan ESI, prinsip ionisasi berbeda. APCO lebih cocok untuk senyawa polaritas rendah dan menengah. Sistem APCI menguapkan molekul pelarut dan sampel dengan menyemprotkan larutan sampel ke dalam pemanas (dipanaskan sampai sekitar 400 ° C) menggunakan gas, seperti N₂. Molekul pelarut terionisasi oleh pelepasan unit jarum yang melepaskan korona untuk menghasilkan ion reaksi yang stabil. Yang dimaksud dengan pelepasan korona secara pengertian kasar adalah pelepasan listrik yang disebabkan oleh ionisasi cairan seperti udara di sekitar konduktor yang bermuatan listrik.



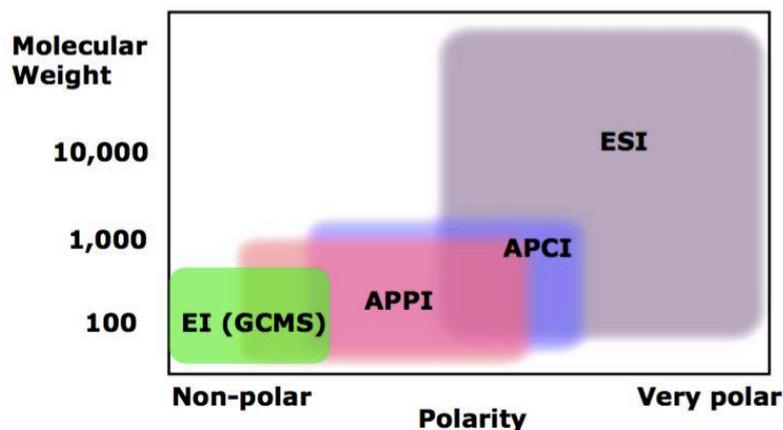
Gambar 20. Reaksi ion-molekul dari sistem APCI (Shimadzu, 2010)

Proton ditransferkan antara ion-ion reaksi dan molekul sampel (reaksi ion-molekul) untuk mengionisasi molekul sampel dengan penambahan atau penghilangan proton. Reaksi ion-molekul melibatkan beberapa jenis reaksi, antara lain reaksi transfer proton dan reaksi adisi elektrofilik. Seperti halnya pada ESI, molekul yang terprotonasi (atau molekul terdeprotonasi) dapat terdeteksi, sehingga dapat digunakan untuk menganalisis senyawa yang sangat larut dalam lemak atau senyawa yang tidak terionisasi dalam larutan.

Prinsip-prinsip ionisasi dengan APCI:

1. Gas pelarut yang dipanaskan (dari 300 hingga 500 ° C) di dalam probe APCI diionisasi pada terjadinya pelepasan korona karena penerapan tegangan tinggi (± 3 hingga 5 kV) ke jarum.
2. Molekul-molekul sampel terionisasi sebagai hasil dari reaksi ion-molekul (reaksi CI) dengan ion-ion pelarut. Gas nebulizer digunakan untuk menyemprotkan cairan dengan cara yang sama seperti dengan ESI.

Selain tipe ESI dan APCI, terdapat juga sistem ionisasi yang menggabungkan keduanya yang disebut DUIS (*Dual Ion Source*). Pada mode DUIS, tegangan tinggi diterapkan secara bersamaan ke nebulizer untuk ESI dan jarum korona untuk APCI, dan gas kering dipanaskan digunakan untuk membantu ionisasi dalam mode APCI. Probe ESI disediakan sebagai aksesori standar digunakan sebagai nebulizer untuk ESI.



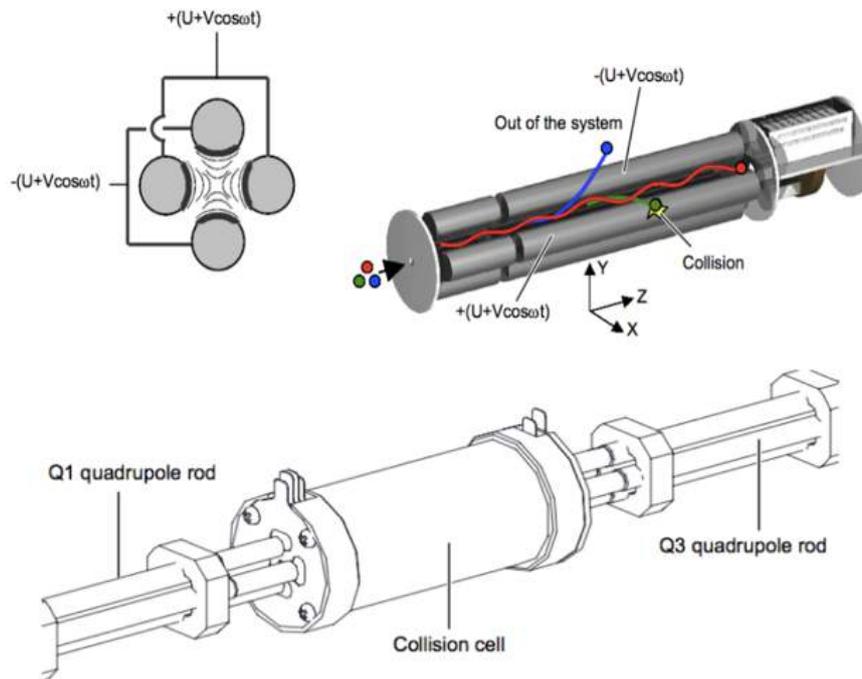
Gambar 21. Skema menunjukkan hubungan antara metode ionisasi dan polaritas analit yang berlaku. Karena berbagai senyawa yang sangat besar dapat diukur menggunakan KCKT saja, penggunaan ESI atau APCI secara selektif karena metode ionisasi sekarang memungkinkan pengukuran jangkauan yang lebih luas dari senyawa organik juga.

Unit Analisis

Instrumentasi pada Kuadrupol

Unit analisis pada sistem kuadrupol terdiri dari mengandung empat batang logam silinder silindris (elektroda dengan permukaan interior hiperboloidal) di dalam ruang vakum, diposisikan berjarak sama dari sumbu tengah (Gambar 23).

Ion yang dihasilkan dalam unit ionisasi dipercepat dalam arah sumbu-Z oleh tegangan yang relatif lemah dari beberapa volt dan dimasukkan ke zona kuadrupol melalui lubang kecil. Dalam kuadrupol, tegangan polaritas yang sama diterapkan ke elektroda yang berlawanan, sementara tegangan dengan positif dan negatif terbalik diterapkan ke elektroda yang berdekatan. Ketika kedua tegangan DC yaitu U dan frekuensi tinggi tegangan AC yaitu $V \cos \omega t$ (ω , frekuensi sudut tinggi; t , waktu) diterapkan ke masing-masing elektroda, medan listrik yang mengubah fase pada kecepatan tinggi dihasilkan dalam kuadrupol. Medan listrik ini menyebabkan ion yang melewatinya berosilasi dalam arah sumbu X dan Y. Jika kondisi spesifik (U , V , ω) dikenakan pada saat ini, ion dalam kisaran rasio massa-muatan tertentu tertentu (m/z) masuk ke keadaan "osilasi stabil" dan dapat melewati quadropole dan mencapai detektor. Ion dengan rasio m/z di luar rentang ini berosilasi tidak stabil dan bertabrakan dengan elektroda atau terbang keluar dari sistem, sehingga tidak terdeteksi



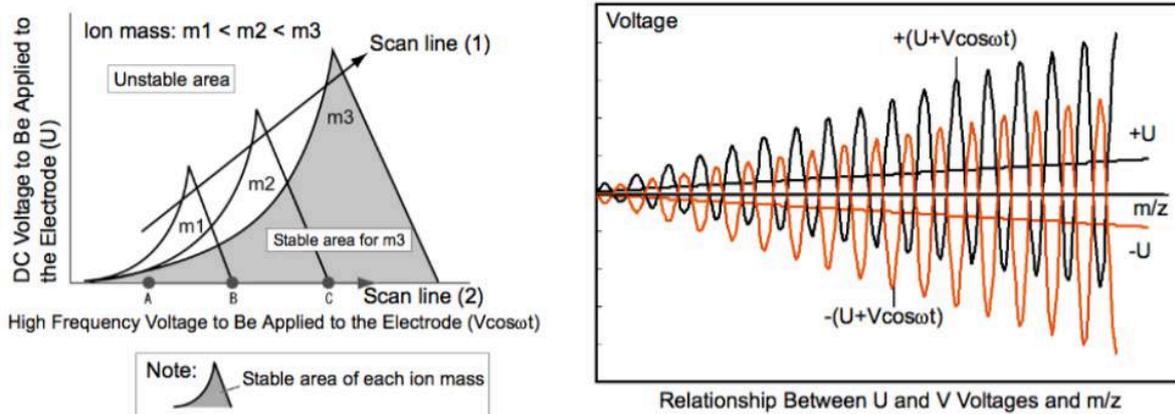
Gambar 22. Diagram tampak samping sistem kuadropol (gambar atas) dan sistem kuadropol rangkap tiga (*triple quadrupole*) spektrometri massa (Shimadzu, 2010)

Akibatnya, ion yang melewati medan listrik ini berosilasi dalam arah X dan Y. Ketika satu set kondisi tertentu (untuk U, V, dan ω) diterapkan, **ion tertentu dalam rasio massa-muatan tertentu (m/z) mempertahankan osilasi stabil dan melewati kuadropol untuk mencapai detektor**. Sebaliknya, osilasi ion dengan nilai m/z lainnya menjadi tidak stabil, menyebabkan mereka bertabrakan dengan kutub, terbang keluar dari sistem, atau tidak terdeteksi.

Osilasi ion dalam kuadropol diketahui terjadi sesuai dengan persamaan yang disebut persamaan Mathieu. Terlepas dari kecepatan awal atau posisi awal ion, gerakan ion memenuhi persamaan:

$$m/z = K \frac{V}{r^2 \omega^2}$$

Diagram sederhana menggambarkan bagaimana persamaan diselesaikan (Gambar 24). Kondisi yang diperlukan untuk osilasi ion stabil ditentukan oleh massa m dan frekuensi osilasi ω dari ion. Ini diilustrasikan sebagai area yang tertutup oleh garis pada Gambar 24. Wilayah stabilitas berbeda untuk ion dengan massa m_1 , m_2 , dan m_3 . Akibatnya, jika tegangan divariasikan sambil menjaga rasio antara tegangan arus searah dan frekuensi tinggi tegangan arus bolak-balik (garis pemindaian lurus (1)), sehingga garis (1) melewati masing-masing daerah stabilitas untuk m_1 , m_2 , dan m_3 , ion dengan massa m_1 , m_2 , dan m_3 dapat dilewatkan melalui kuadropol secara berurutan. Dengan cara ini, spektrum massa dapat diperoleh untuk ion dengan massa mulai dari kecil hingga besar.

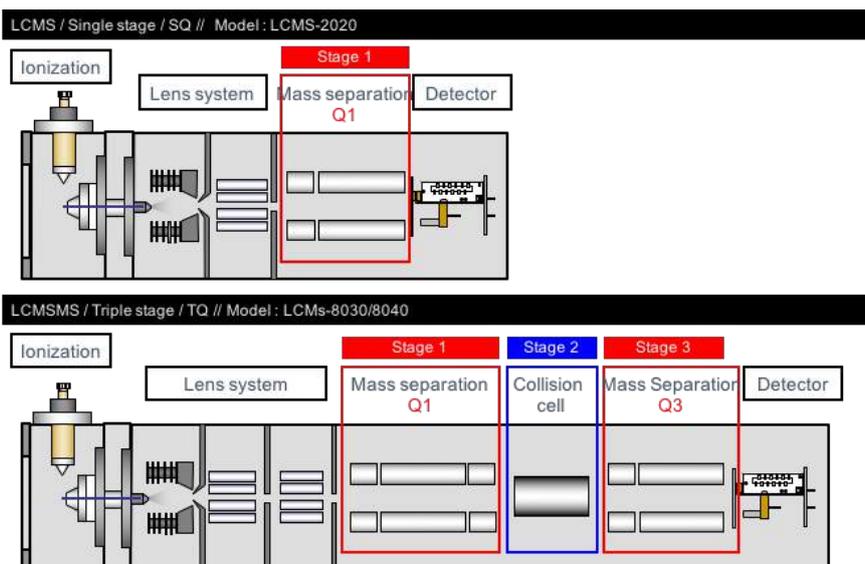


Gambar 23. Wilayah stabil untuk ion di sistem kuadrupol MS (diagram Mathieu) (Shimadzu, 2010).

Karakteristik Quadrupole MS

Karena sistem kuadrupol MS kompak dan sederhana, mereka lebih mudah dioperasikan dan lebih mudah dirawat dan relatif lebih murah. Akibatnya, mereka telah banyak diadopsi sebagai instrumen tujuan umum. Spektrometer massa membutuhkan tingkat vakum yang tinggi, sedangkan sistem MS quadrupole mampu memisahkan ion pada tingkat vakum yang lebih rendah (10⁻² hingga 10⁻³ Pa) daripada metode pemisahan massa lainnya. Oleh karena itu, bahkan jika mereka dihubungkan dengan unit GC atau LC, penurunan tingkat vakum yang disebabkan oleh antarmuka memiliki efek minimal pada kinerja pemisahan massa, membuatnya paling cocok untuk berinteraksi dengan kromatografi.

Selanjutnya, dengan kecepatan pemindaian maksimum sekitar 6000 amu/detik, ia mampu mengukur pada kecepatan pemindaian yang lebih tinggi daripada sistem MS sektor magnetik, dan rentang pengukuran massanya hingga sekitar 2000 m/z memungkinkan analisis kualitatif dalam rentang praktis dari massa molekuler. Selain itu, ia memungkinkan *switching* berkecepatan tinggi, yang memungkinkan pemantauan simultan beberapa ion terpilih (SIM) untuk analisis kuantitatif simultan-sensitivitas tinggi dari beberapa komponen. Dengan cara ini, sistem kuadrupol MS dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif, menjadikannya sistem standar *de-facto* di antara spektrometer massa.



Gambar 24. Diagram skema sistem kuadrupol pada dua sistem spektrometri massa tipe kuadrupol tunggal (*single quadrupole*) dan tiga kuadrupol (*triple quadrupole*). Shimadzu memiliki sistem seri LCMS-2020 untuk kuadrupol tunggal dan LCMS-8030/8040 untuk tiga kuadrupol.

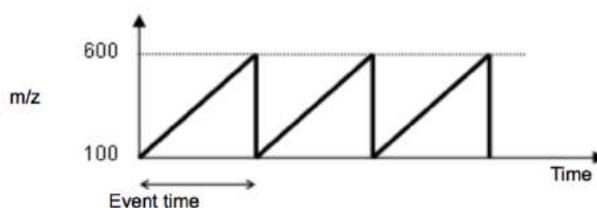
Ruang Tubrukan (*Collision Cell*)

Collision-induced dissociation (CID) adalah teknik spektrometri massa untuk menginduksi fragmentasi ion molekuler dalam fase gas. Ion-ion molekuler biasanya dipercepat oleh beberapa potensial listrik menjadi energi kinetik tinggi dan kemudian dibiarkan bertabrakan dengan molekul netral (seringkali helium, nitrogen atau argon). Dalam tabrakan, beberapa energi kinetik diubah menjadi energi internal yang menghasilkan kerusakan ikatan dan fragmentasi ion molekuler menjadi fragmen yang lebih kecil. Dalam spektrometer massa kuadrupol rangkap tiga ada tiga kuadrupol (Gambar 22 bawah). Kuadrupol pertama yang disebut Q1 dapat bertindak sebagai filter massa dan mentransmisikan ion yang dipilih dan mempercepatnya menuju Q2 yang disebut ruang tubrukan (*Collision Cell*). Tekanan di Q2 lebih tinggi dan ion bertabrakan dengan gas netral dalam sel tubrukan dan terfragmentasi oleh CID. Fragmen kemudian dipercepat keluar dari sel tubrukan dan memasuki Q3 yang memindai melalui rentang massa, menganalisis fragmen yang dihasilkan (saat mereka menabrak detektor). Ini menghasilkan spektrum massa dari fragmen CID dari mana informasi atau identitas struktural dapat diperoleh. Banyak eksperimen lain yang menggunakan CID pada kuadrupol rangkap tiga seperti pemindaian ion prekursor yang menentukan di mana fragmen tertentu berasal dan bukan fragmen apa yang dihasilkan oleh molekul tertentu.

Jenis Mode Analisa

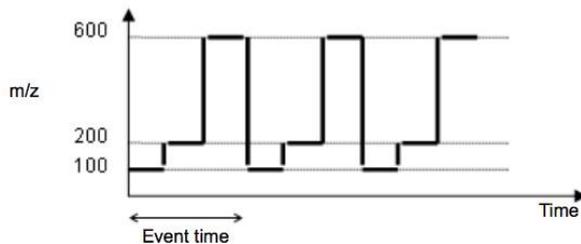
Pada spektrometri massa dengan sistem kuadrupol rangkap tiga biasanya memiliki tujuh mode analisa kualitatif untuk beberapa target. Mode tersebut adalah *Scan Mode*, *SIM Mode*, *MS/MS Analysis Mode*, *Precursor Ion Scan Mode*, *Product Ion Scan Mode*, *Neutral Loss Scan Mode*, dan *MRM Mode*.

Mode pengukuran *scan* adalah metode di mana pengukuran dilakukan saat memindai rentang massa sekali setiap interval tetap, misalnya pada tingkat pengambilan sampel. Dalam hal ini spektrum massa diperoleh sekali setiap interval tetap. Metode ini terutama digunakan untuk analisis kualitatif untuk memonitor secara lengkap komposisi dari sampel. Sebagai contoh kita melakukan pemindaian dari m/z 100 s.d. 600, seperti diagram pada gambar dibawah (Gambar 25). Jika kita membuat waktu pemindaian 1 detik, berarti dari rentang m/z 100 s.d. 600, yang memiliki interval 500, akan dilakukan pemindaian dalam 1 detik. Inilah yang dinamakan dengan kecepatan pemindaian sebesar 500 u/detik. Setiap instrumen memiliki kemampuan dalam kecepatannya, misalnya untuk spektrometri massa seri LCMS-8030 dari Shimadzu yang kami pakai di laboratorium memiliki kemampuan kecepatan maksimum sebesar 15.000 u/detik dengan Mode Scan Q3.



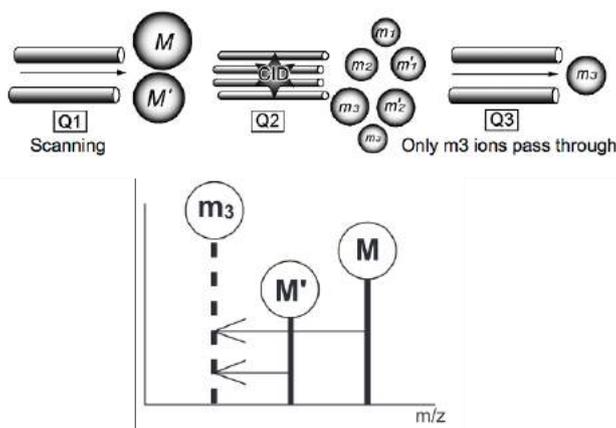
Gambar 25. Ilustrasi pemindaian dari m/z 100 s.d. 600 dengan menunjukkan parameter waktu kejadian (*event time*).

Dalam pengukuran dimana *scan* spektrum massa perlu diperoleh terus menerus, maka dapat dipakai mode SIM (*Selected Ion Monitoring*), yaitu metode dimana hanya ion dengan massa target yang terdeteksi secara selektif. Dibandingkan dengan pengukuran scan, ini memungkinkan analisis sensitivitas tinggi tanpa waktu deteksi yang terbuang pada pendeteksian ion dengan massa yang tidak diperlukan. Karena ketinggian puncak dan area juga stabil, SIM biasanya digunakan untuk analisis kuantitatif. Sebagai contoh tiga jenis ion pada m/z 100, 200 dan 600 dianalisis menggunakan SIM seperti diagram dibawah ini (Gambar 26). Hingga 32 saluran dapat diatur untuk satu kejadian. 512 kejadian (*event*) dapat dikonfigurasi.



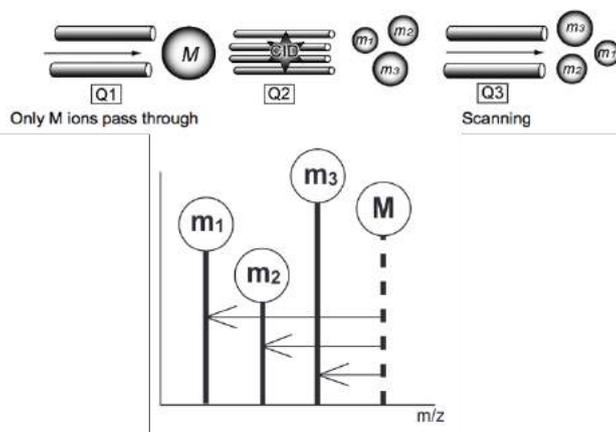
Gambar 26. Diagram ilustrasi contoh mode pengukuran SIM pada m/z 100, 200 dan 600 dengan waktu kejadian (*event time*) yang ditentukan.

Metode analisis dalam mode *Precursor Ion Scan* ini melibatkan pemindaian dalam Q1, menetapkan Q3 pada suatu m/z yang spesifik, dan secara selektif menganalisis ion yang dihasilkan dalam CID. Ini memungkinkan pemeriksaan ion prekursor dengan ion produk umum. Mode ini cocok untuk menyaring ion dengan sub-struktur umum sehingga kita dapat merunut balik ion prekursor dari ion fragmen yang dideteksi pada Q3. Sumbu horizontal dari spektrum massa yang ditampilkan menunjukkan skala Q1 dan sumbu vertikal menunjukkan intensitas ion produk.



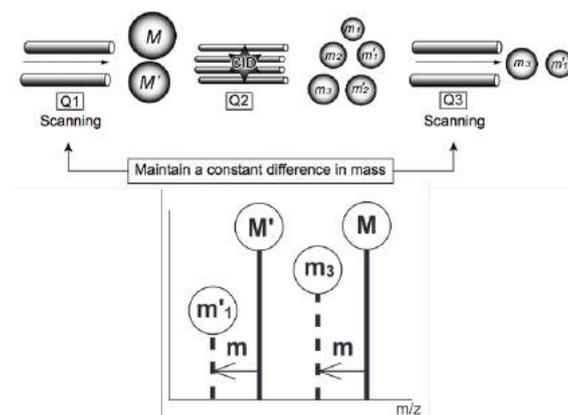
Gambar 27. Diagram pengukuran dengan menggunakan mode *Precursor Ion Scan* (Shimadzu, 2010)

Metode analisis dalam mode *Product Ion Scan* melibatkan menetapkan Q1 pada suatu m/z yang spesifik dan melakukan analisis selektif pada ion prekursor yang dipilih pada Q3 yang dihasilkan dalam CID. Karena spektrum ion produk dapat diperoleh, mode ini cocok untuk memeriksa struktur ion yang dipilih pada Q1. Sumbu horizontal dari spektrum massa yang ditampilkan menunjukkan skala Q3.



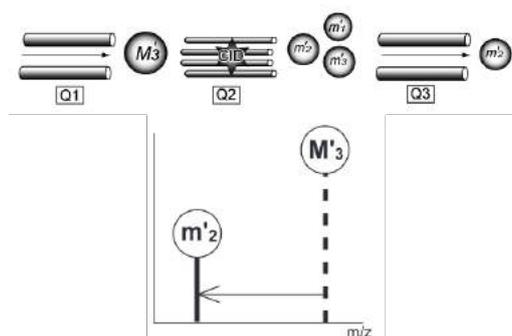
Gambar 28. Diagram pengukuran dengan menggunakan mode *Product Ion Scan* (Shimadzu, 2010).

Metode analisis dalam mode *Neutral Loss Scan* berfungsi untuk mempertahankan perbedaan dalam m/z untuk analisis pada Q1 dan Q3 saat melakukan analisis pemindaian. Ini memungkinkan pemindaian terhadap ion yang diserap dari fragmen netral umum. Seperti halnya mode pemindaian ion pendahulu, mode ini cocok untuk mengamati ion dengan sub-struktur umum (fragmen netral). Umumnya, sumbu horizontal dari spektrum yang ditampilkan menunjukkan skala Q1 dan sumbu vertikal menunjukkan intensitas ion produk.



Gambar 29. Diagram pengukuran dengan menggunakan mode *Neutral Loss Scan* (Shimadzu, 2010).

Metode analisis dalam mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) melibatkan pengaturan untuk menetapkan Q1 dan Q3 mengamati pada m/z yang spesifik dan analisis selektif terhadap ion. Ion prekursor dipilih pada Q1 dan ion-ion produk yang mengandung informasi struktural yang dihasilkan dalam CID dipilih pada Q3. Karena baik ion prekursor dan ion produk ditentukan dan dimonitor, analisis kuantitatif yang sangat selektif yang rendah pada zat yang tidak diinginkan dapat dicapai dibandingkan dengan pengukuran SIM. Ini berarti mode ini efektif dalam menentukan jumlah jejak konstituen yang terkandung dalam sampel matriks besar. Hanya kromatogram yang dapat diperoleh dalam mode MRM karena pemindaian tidak dilakukan. Mode MRM sangat cocok misalnya untuk kasus studi metabolomik, misalnya mengamati perubahan metabolit sekunder pada suatu buah tomat sebagai respons terhadap lingkungan yang berbeda dan dimana metabolit sekunder target yang diteliti tersebut sudah diketahui ion prekursor dan ion produknya.

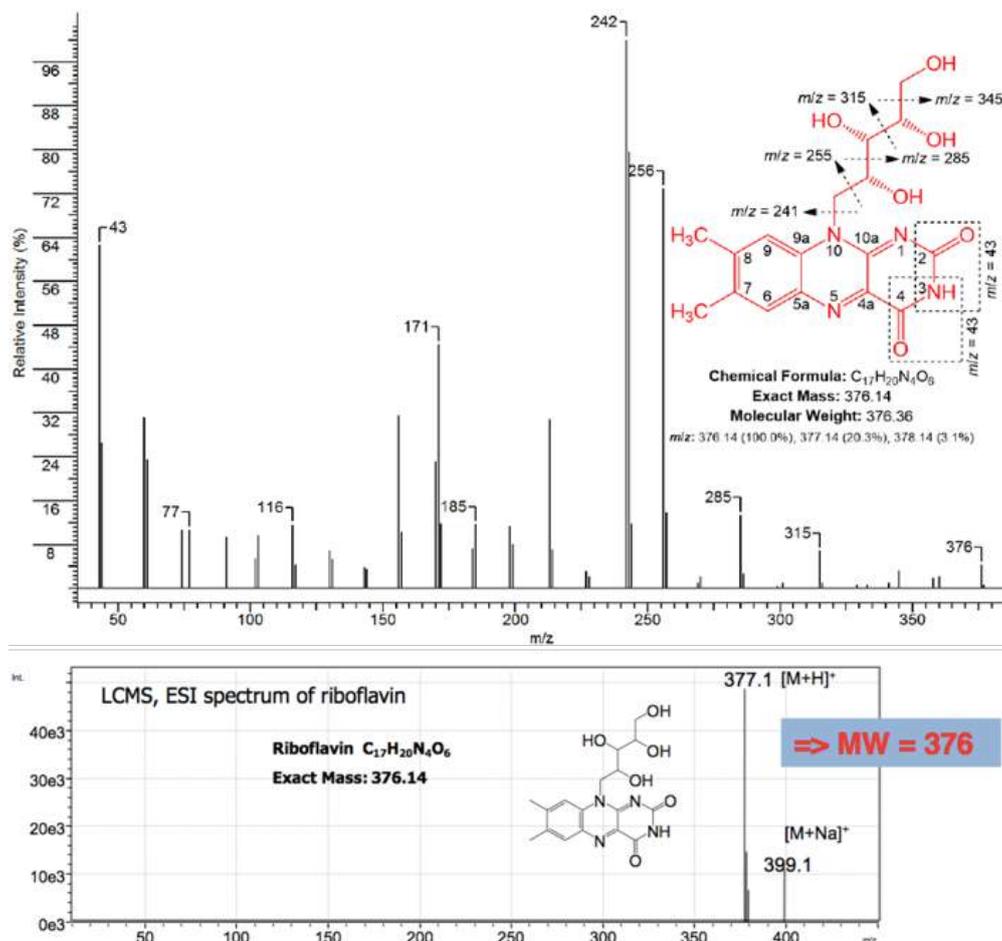


Gambar 30. Diagram pengukuran dengan menggunakan mode MRM (Shimadzu, 2010).

Ion spesifik dipilih dalam filter massa kuadrupol pertama (Q1) dalam mode analisis MS/MS. Ion-ion yang dipilih ini disebut sebagai ion prekursor. Ion-ion prekursor bertabrakan dengan gas inert dalam ruang tumbukan (tumbukan-induksi disosiasi, CID) untuk menghasilkan ion produk. Dengan mengukur ion produk dalam filter massa kuadrupol kedua (Q3), kita dapat memperoleh informasi mengenai struktur ion prekursor. Metode analisis ini disebut sebagai MS/MS. Empat jenis analisis dimungkinkan dengan mengkonfigurasi analisis pemindaian atau analisis SIM untuk Q1 dan Q3.

Spektra Massa

Seperti yang dijelaskan sebelumnya, ESI dan APCI menghasilkan pendeteksian molekul terprotonasi dan juga ion adisi logam atau pelarut. Sub-bab ini, kita membandingkan metode tersebut dengan ionisasi elektron (EI) yang umum digunakan dalam GC-MS. Gambar 31 menunjukkan spektrum untuk vitamin B2 (riboflavin) yang diperoleh menggunakan ESI. Spektrum tersebut digambarkan dengan intensitas ion atau disebut TIC (*total ion current*) pada sumbu vertikal (y) dan rasio massa-ke-muatan (m/z) pada sumbu horizontal (x).

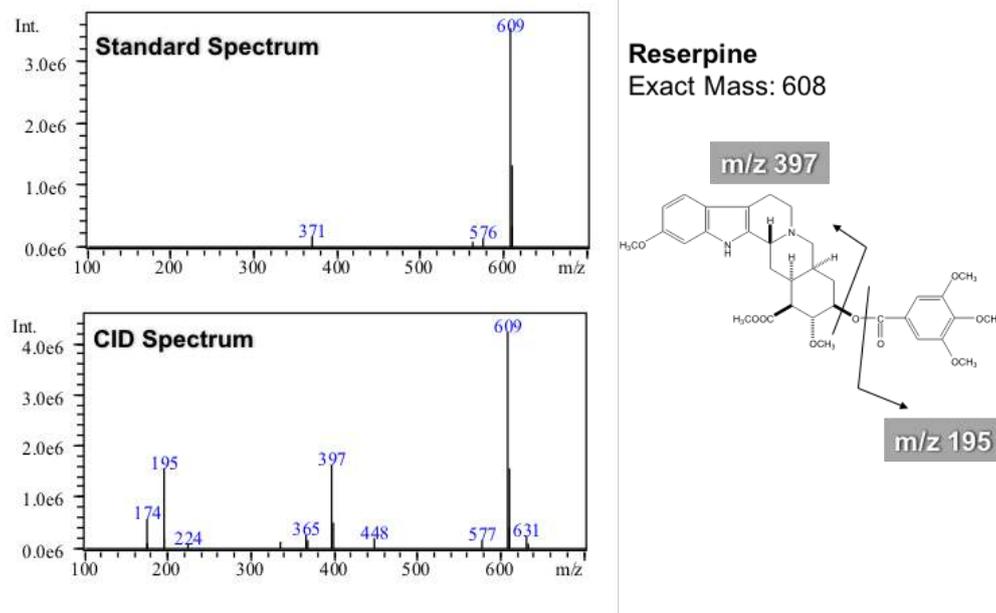


Gambar 31. Spektra massa dari vitamin B2 dengan menggunakan metode EI (atas) dan ESI (bawah).

EI menggunakan berkas elektron untuk membebaskan satu elektron dari molekul yang dalam fase gas sehingga menciptakan ion molekuler (kation radikal). Dan kemudian langsung terpecah untuk menghasilkan sekelompok fragmen ion. Informasi struktur dari molekul dapat diperoleh dengan mempertimbangkan pola fragmentasi ion dari senyawa analit. Namun, dalam banyak kasus, tidak ada puncak-puncak ion molekuler yang terdeteksi. Dalam kasus Gambar 31 bagian atas, senyawa riboflavin (B2) memiliki massa sebesar 376.14, namun pada spektrum massa dengan EI tidak ada ion molekuler yang terdeteksi pada m/z sebesar massa tersebut, tetapi lebih tepatnya, hanya molekul yang terpecah-pecah sebagai fragmen ion yang terdeteksi. Memperoleh informasi massa molekul sulit menggunakan EI, yang membutuhkan menggunakan metode analitik komplementer seperti ionisasi kimia (CI).

Sebaliknya, menggunakan ESI, yang merupakan metode ionisasi lembut, memberikan spektrum sederhana dengan molekul terprotonasi yang terdeteksi pada m/z 377.1 yang mengacu pada ion positif molekuler riboflavin yang mengalami penambahan proton atau disimbolkan dengan $[M+H]^+$ dan ion natrium adisi yang terdeteksi pada m/z 399.1, $[M+Na]^+$, dan hampir tidak ada fragmen ion. Dengan cara

ini, informasi massa molekul, yang penting untuk memprediksi struktur senyawa yang tidak diketahui, dapat diperoleh dengan mudah menggunakan metode ionisasi tekanan atmosfer. (Dalam contoh ini, karena vitamin B2 memiliki kelompok fungsional dasar, maka mode ion positif digunakan.) Namun, karena penggunaan API cenderung tidak menghasilkan fragmen ion, tampaknya sulit untuk mendapatkan informasi struktural dari kelompok fungsional dan lainnya dengan menganalisis ion fragmen.



Gambar 32. Spektrum disosiasi tabrakan terinduksi dari senyawa reserpine yang didapatkan dengan pengukuran mode *Product Ion Scan* untuk mengamati fragmen-fragmen ion yang dihasilkan dari prekursor pada m/z 609.

Namun demikian, informasi struktural dapat diperoleh dengan menggunakan API jika menggunakan metode yang disebut disosiasi tubrukan-induksi (*collision induced dissociation*, CID) untuk membuat fragmen ion, kemudian mengukur ion fragmen tersebut. Dalam sistem spektrometri jenis tandem atau *triple quadrupole*, CID dapat terjadi dihasilkan pada area ruang tubrukan (*collision cell*) yaitu pada kuadropol ke-2 (Gambar 32). Gambar 32 menunjukkan contoh menghasilkan ion fragmen dari senyawa reserpine dengan massa tepat 608, dengan menggunakan CID maka didapatkan ion prekursor pada m/z 609, $[M+H]^+$ dan kedua fragmen ion pada m/z 397 dan m/z 195. Ion-ion ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi komponen minor yang muncul di kromatogram (lihat Shimadzu Application News, LCMS No. C21)

Soal-soal pertanyaan

1. Apakah keuntungan yang ditawarkan oleh spektrometri massa sebagai detektor pada KCKT dibandingkan dengan detektor UV-Vis?
2. Berikan penjelasan cara kerja kedua sistem ionisasi tekanan atmosfer!
3. Mengapa tipe ionisasi ESI dinamakan ionisasi lembut? Jenis senyawa seperti apa yang cocok dianalisa dengan ESI? Bagaimanakah ion yang terbentuk melalui ionisasi ESI?
4. Apakah yang dimaksud dengan ion prekursor dan ion produk?
5. Jelaskan apakah yang disebut

BAB 3 Spektroskopi

Bab ini kita akan membahas dengan singkat dan umum interaksi radiasi ultraviolet, tampak, dan inframerah dengan senyawa, sehingga dapat menjadi landasan metode analitik bagi mahasiswa untuk memahami analit yang diuji. Pengembangan metode spektroskopi non-destruktif dalam dekade terakhir sangat cepat. Identifikasi dari molekul yang tidak diketahui dengan kompleksitas yang tinggi telah menjadi pekerjaan rutin bagi kimiawan, bahkan dengan jumlah sampel yang hanya beberapa nanogram hingga miligram.

Terdapat empat teknik yang rutin digunakan oleh kimiawan untuk menganalisa struktur senyawa. Spektroskopi ultraviolet-tampak adalah metode pertama yang digunakan sejak tahun 1930-an. Spektroskopi inframerah digunakan sejak 1940-an. Kemudian disusul dengan pengembangan spektroskopi resonansi magnetik inti (*nuclear magnetic resonance, NMR*) dan spektrometri massa (*mass spectrometry, MS*).

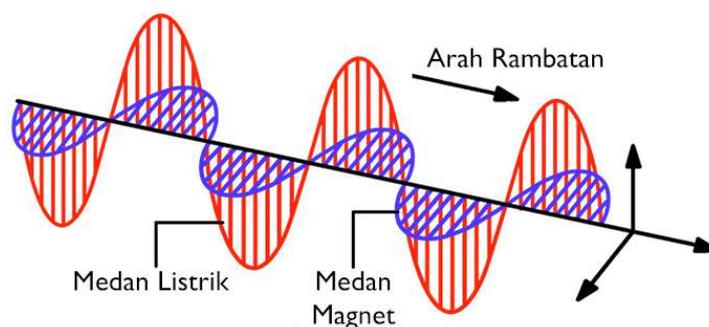
Dalam instrumentasi, teknik spektroskopi ultraviolet, tampak dan inframerah menggunakan instrumen optika untuk mengarahkan, memecah dan memfokuskan radiasi elektromagnetik menuju objek sampel yang diteliti, sehingga metode tersebut oleh para fisikawan sering disebut dengan spektroskopi optika. Namun untuk kenyamanan pembahasan kita hanya akan menggunakan terminologi spektroskopi untuk merujuk spektroskopi optika. Sedangkan pada pembahasan MS biasanya kita memberikan terminologi spektrometri.

Konsep dasar interaksi gelombang elektromagnetik dan molekul

Dalam pendekatan klasik, radiasi elektromagnetik dapat dipertimbangkan sebagai suatu gelombang medan listrik yang merambat bersama-sama dengan komponen magnetiknya secara ortogonal pada frekuensi yang sama (Gambar 33). Dengan pendekatan tersebut, maka radiasi elektromagnetik dapat dideskripsikan melalui parameter frekuensi atau panjang gelombangnya. Kedua parameter tersebut secara proporsional terbalik satu dengan yang lain sesuai dengan persamaan:

$$\lambda \nu = c \quad (3.1)$$

Dimana λ merupakan panjang gelombang radiasi, ν adalah frekuensi radiasi elektromagnetik dan c adalah besaran kecepatan cahaya.



Gambar 33. Bentuk teori klasik gelombang penggambaran dari radiasi elektromagnetik

Dengan persamaan 3.1 tersebut maka suatu radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang yang pendek (atau frekuensi yang tinggi), berarti memiliki energi yang tinggi dan begitu pula sebaliknya. Molekul organik yang menyerap radiasi elektromagnetik dengan berbagai panjang gelombang dan kemudian mengalami transisi-transisi energi merupakan konsekuensi dan transfer energi yang

berlangsung. Namun demikian, teori klasik tidak memberikan gambaran utuh terkait proses transfer energi tersebut. Di dalam deskripsi mekanika kuantum, radiasi elektromagnetik dipertimbangkan sebagai paket-paket energi yang disebut foton. **Foton** inilah yang memiliki besaran energi yang spesifik yang sering disebut **terkuantifikasi**. Energi dari setiap foton dapat diturunkan dengan relasi persamaan:

$$E = h \nu \quad (3.2)$$

Dimana h adalah konstanta Plank sebesar $6,626 \times 10^{-34}$ Joule detik.

Dengan deskripsi tersebut, keterlibatan kuantum energi membuat kita lebih mengerti bukti bahwa transfer suatu energi tidak terjadi secara kontinu, namun hanya terjadi apabila besaran energi yang ditransferkan setara dengan transisi yang berlangsung. Dengan demikian, eksitasi molekul organik melibatkan suatu proses absorpsi kuantum spesifik dari radiasi elektromagnetik. Energi kuantum yang ditransferkan ke molekul tersebut yang menyebabkan transisi ke tahap energi yang lebih tinggi, dengan kata lain eksitasi ke tahap yang lebih tinggi bergantung pada jumlah energi yang diserap. Selisih antara keadaan energi yang lebih rendah dengan keadaan energi yang lebih tinggi dari suatu molekul yang menyerap energi dapat diekspresikan dalam persamaan:

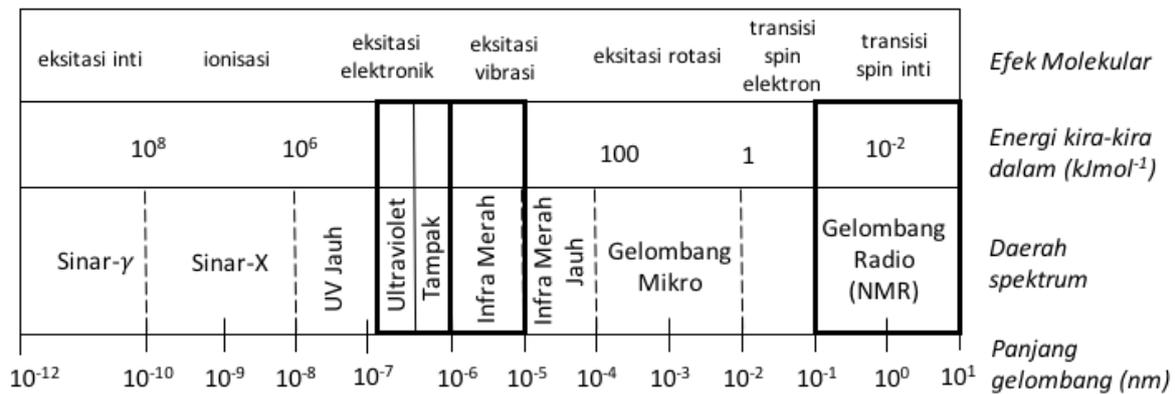
$$\Delta E = h \nu \quad (3.3)$$

Dengan memperhatikan persamaan 3.1 dan 3.3 tersebut, maka panjang gelombang absorpsi dan frekuensi memberikan informasi terkait energi yang terkait dengan suatu eksitasi yang sangat berkorelasi dengan gugus-gugus fungsional yang terlibat dalam absorpsi tersebut. Sedangkan intensitas absorpsi merefleksikan kemudahan transisi dan konsentrasi dari molekul yang menyerap. Kita akan memahami konsep ini lebih lanjut dengan mempelajari secara spesifik konsep dalam spektroskopi absorpsi.

Konsep spektroskopi absorpsi

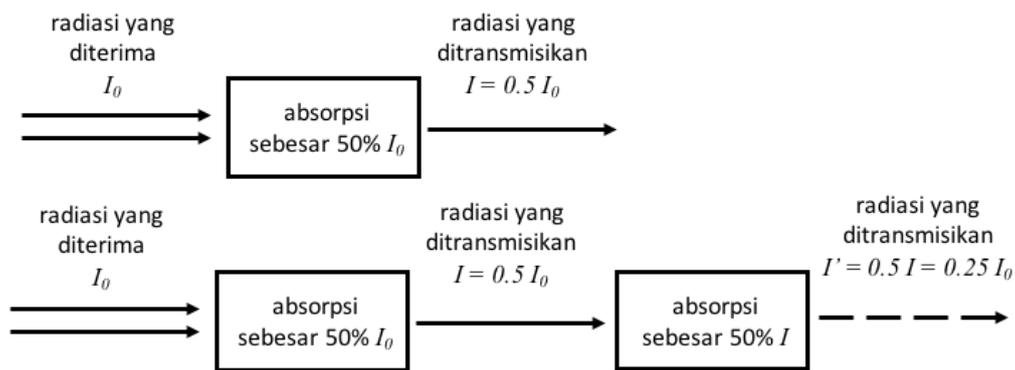
Peningkatan energi radiasi elektromagnetik dapat menyebabkan terjadinya transisi rotasi, vibrasi, dan elektronik dari suatu molekul dan frekuensi spektrum elektromagnetik tersebut sangat bermanfaat bagi kimiawan untuk menganalisa sifat suatu molekul. Radiasi elektromagnetik di daerah spektrum ultraviolet dan tampak memiliki energi yang cukup untuk menyebabkan elektron ikatan tereksitasi ke orbital yang lebih tinggi atau dinamakan eksitasi elektronik (Gambar 34). Dalam molekul organik, ini merupakan ciri khas dari ikatan rangkap terkonjugasi dimana elektron π terdelokalisasi pada seluruh sistem menyebabkan turunnya celah energi antara orbital tertinggi molekul yang terisi (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) dan orbital terendah molekul tak terisi (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO). Bagian khas dari molekul organik yang menyerap radiasi elektromagnetik pada daerah ultraviolet dan tampak disebut sebagai **kromofor**.

Radiasi inframerah yang memiliki frekuensi yang lebih rendah tidak mampu menyebabkan eksitasi elektronik, namun energi yang diserap ini hanya mampu untuk menyebabkan ikatan bervibrasi. Energi yang dibutuhkan untuk suatu ikatan bervibrasi merenggang dan membengkok ini bergantung pada konstanta gaya, yang juga bergantung pada jenis ikatan apakah ikatan tunggal atau ganda. Sedangkan frekuensi gelombang radio yang dihasilkan oleh medan magnet yang tinggi menyebabkan transisi spin inti. Teknik ini dikenal dengan nama spektroskopi resonansi magnetik inti, teknik yang digunakan secara intensif dalam penentuan struktur molekul organik.



Gambar 34. Spektrum elektromagnetik.

Terdapat tiga faktor yang mempengaruhi intensitas absorpsi radiasi elektromagnetik. Faktor yang pertama adalah **kemungkinan transisi**, yang didefinisikan sebagai suatu ukuran bisa tidaknya suatu transisi dapat terjadi. Hal ini kita sebut dengan apakah transisi itu **dijinkan** (*allowed*) atau **terlarang** (*forbidden*). Definisi yang lebih lengkap akan kita diskusikan di bagian pembahasan spektroskopi absorpsi uv-tampak. Faktor yang kemudian adalah **konsentrasi** dan **jarak tempuh** (*path length*) dari sampel, yang keduanya merefleksikan jumlah molekul dimana radiasi elektromagnetik harus melaluinya.



Gambar 35. Ilustrasi efek menggandakan jarak tempuh pada intensitas penyerapan

Apabila sampel menyerap 50% dari radiasi yang diterima, dan apabila jarak tempuh digandakan, maka sampel tambahan tersebut akan menyerap 50% dari radiasi yang tersisa yang diterima (Gambar 29). Namun demikian ilustrasi ini dapat diaplikasikan apabila semua molekul dalam sampel berkontribusi dalam absorpsi. Dengan kata lain molekul yang terdistribusi dalam pelarut tidak saling menghalangi serapan dari radiasi yang diterima. Hubungan antara konsentrasi, jarak tempuh dan absorpsi dapat dijelaskan dengan **hukum Beer-Lambert**:

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon c l \quad (3.4)$$

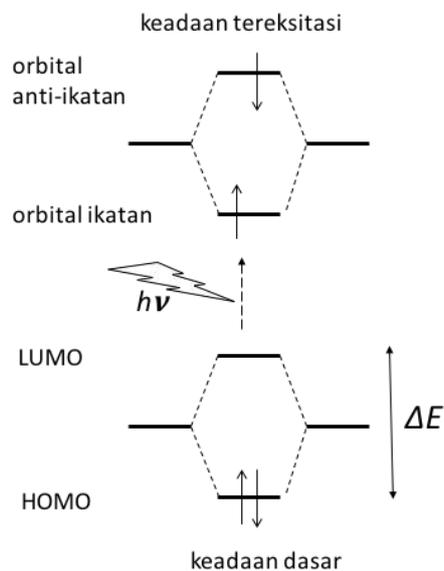
dimana ϵ merupakan koefisien ekstinsi, suatu besaran yang merefleksikan kemungkinan transisi dan merupakan besaran yang sudah ditentukan dari suatu transisi. Apabila transisi diijinkan, maka koefisien ekstinsi memiliki besaran yang besar, demikian sebaliknya.

Spektroskopi absorpsi uv-tampak

Konsep dasar untuk molekul

Absorpsi radiasi elektromagnetik di daerah uv-tampak mentransfer sejumlah energi yang tepat untuk menyebabkan transisi dalam tingkat-tingkat energi elektronik dari ikatan molekul dan menghasilkan eksitasi elektron dari keadaan dasar ke keadaan tereksitasi (Gambar 36). Namun seperti yang telah

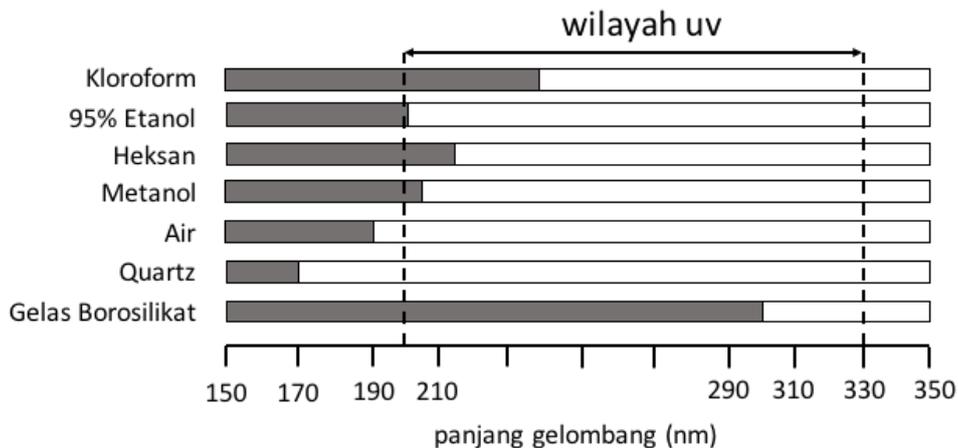
dibahas sebelumnya, penyerapan tersebut hanya akan terjadi jika energi foton sesuai persis dengan energi transisi. Kita akan melihat bahwa energi yang lebih tinggi, panjang gelombang yang lebih pendek, cahaya diperlukan untuk mengeksitasi ikatan- σ daripada ikatan- π karena terdapat perbedaan energi yang lebih besar antara orbital-orbital σ ikatan (*bonding*) dan anti-ikatan (*antibonding*) dibandingkan dengan orbital-orbital ikatan dan anti-ikatan pada orbital-orbital π . Dalam nomenklatur spektroskopik fitur struktural dari molekul yang bertanggung jawab untuk penyerapan sinar UV disebut sebagai **kromofor**.



Gambar 36. Serapan foton yang memiliki energi yang tepat dengan energi antara orbital ikatan dan orbital anti-ikatan dapat menghasilkan eksitasi suatu elektron antara keadaan ini.

Molekul yang menyerap radiasi uv di wilayah di bawah sekitar 150 nm, karena panjang gelombang radiasi elektromagnetik ini memiliki energi tinggi dan sesuai dengan yang diperlukan untuk menyebabkan eksitasi elektron dalam kerangka ikatan- σ . Akibatnya molekul di atmosfer akan menyerap radiasi ini, dan oleh karena itu analisis di wilayah ini membutuhkan teknik vakum khusus.

Dalam analisis spektroskopi uv-tampak yang standar, dilakukan pada larutan sampel yang encer dan direferensikan ke sampel pelarut murni. Dalam situasi ini, pemilihan pelarut yang tepat perlu dipertimbangkan sehingga serapan oleh pelarut perlu dihindari agar senyawa terlarut yang sedang diselidiki dapat terukur dengan baik. Beberapa pelarut umum dan rentang transparansi mereka diberikan di Gambar 37. Selain mempertimbangkan pelarut, harus diingat bahwa kaca borosilikat dapat menutupi sinyal dari senyawa pada panjang gelombang di bawah 300 nm. Analisis uv dilakukan dalam kuvet kuarsa (*quartz cuvettes*) yang transparan hingga sekitar 170 nm, namun untuk spektrum tampak dapat menggunakan kuvet gelas atau plastik.



Gambar 37. Daerah dimana beberapa pelarut umum tidak menyerap di daerah 180-250 nm dalam spektroskopi uv-tampak.

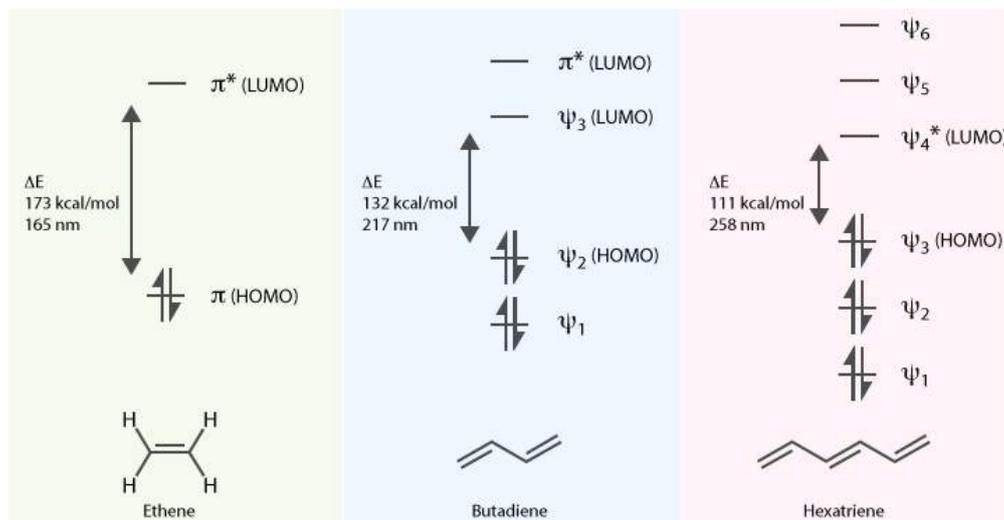
Elektron pada ikatan- π dan pasangan elektron bebas membutuhkan energi yang lebih sedikit daripada elektron ikatan- σ untuk eksitasi pada orbital anti ikatannya dan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang. Ikatan ganda menyerap radiasi uv pada sekitar 190 nm dan pasangan elektron bebas tereksitasi dengan panjang gelombang antara 185-195 nm.

Tabel 4 di bawah ini mencantumkan kromofor dasar yang penting dan jenis transisi elektroniknya. Dengan pengecualian dari transisi simetri terlarang $n \rightarrow \pi^*$, tidak ada yang terjadi dalam rentang rekaman instrumen standar.

Tabel 4. Kromofor-kromofor dasar dan transisi elektroniknya

Kromofor	Transisi Elektronik	λ_{\max} (nm)
Sistem ikatan- σ	C-C, C-H	$\sigma \rightarrow \sigma^*$ ~150
Pasangan elektron bebas	-O-	$n \rightarrow \sigma^*$ ~185
	-N<	$n \rightarrow \sigma^*$ ~195
	-S-	$n \rightarrow \sigma^*$ ~195
	C=O	$n \rightarrow \sigma^*$ ~190
	C=O	$n \rightarrow \pi^*$ ~300
Sistem ikatan- π	C=C	$\pi \rightarrow \pi^*$ ~190

Namun, ketika dua π -orbital digabungkan untuk membentuk diena terkonjugasi elektron- π menjadi terdelokalisasi atas seluruh kerangka- π dan kemudian menimbulkan struktur hibrida resonansi. Celah energi antara orbital tertinggi molekul yang terisi (HOMO) dari hibrida resonansi ini dan orbital terendah molekul tak terisi (LUMO) lebih kecil dari pada alkena yang terisolasi. Akibatnya, eksitasi terjadi dengan panjang gelombang radiasi elektromagnetik yang lebih panjang. Mempertimbangkan Gambar 38 menunjukkan orbital molekul untuk alkena dan diena terkonjugasi memungkinkan kita untuk melihat bagaimana konjugasi mengarah ke penurunan celah HOMO-LUMO dibandingkan dengan sistem yang terisolasi. Pada Gambar 38 tersebut terlihat bahwa berkurangnya celah energi menyebabkan pergeseran panjang gelombang ke lebih panjang.

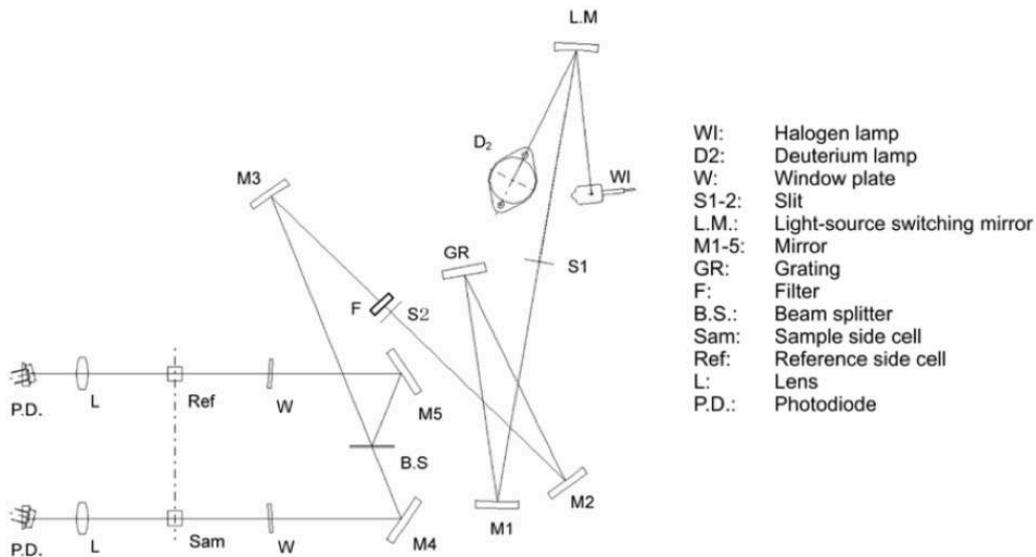


Gambar 38. Diagram orbital molekuler etena, butadiena dan heksatriena dan penurunan celah energi HOMO-LUMO.

Dengan bertambahnya ikatan- π dan semakin luasnya tingkat konjugasi, maka semakin mempersempit kesenjangan antara energi HOMO dan LUMO. Akibatnya, panjang gelombang radiasi yang diperlukan untuk eksitasi menjadi lebih panjang ketika tingkat konjugasi meningkat. Ini adalah sistem terkonjugasi seperti poliena tersebut, disebut sebagai **kromofor**, yang memberikan spektrum absorpsi pada daerah uv-tampak dari spektrum elektromagnetik.

Instrumentasi spektroskopi uv-tampak

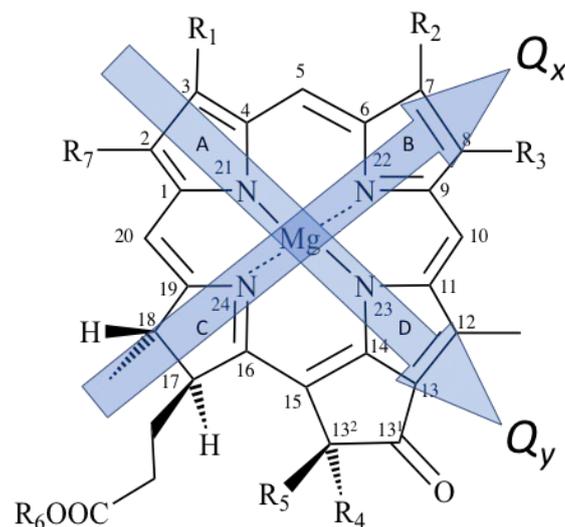
Spektrometer uv-tampak beroperasi pada prinsip sinar ganda (*double beam*), dengan satu sinar yang melewati sampel dan yang lainnya melewati sel referensi (Gambar 39). Spektrometer versi yang digunakan di Gambar 39 tersebut memiliki dua lampu, lampu deuterium (D2) memancarkan cahaya dalam kisaran dari 190 nm s.d. 340.8 nm yang diubah dan lampu halogen dalam kisaran dari 340.8 nm s.d. 1100nm (cahaya tampak). Cahaya yang dipancarkan oleh sumber cahaya (deuterium dan halogen) melewati sebuah cermin yang dapat “switching” sumber cahaya pada kisaran 295 s.d. 364 nm, namun dengan pengaturan normal pada 340.8 nm. Cahaya kemudian diteruskan melalui slit dan kemudian sampai pada kisi defraksi (*grating*) yang berfungsi memecah cahaya menjadi panjang gelombang komponennya dengan cara yang mirip seperti prisma. Cahaya ini kemudian melalui filter dan dipecah oleh *beam splitter*, sehingga menjadi dua sinar yang satu mengenai referensi yang lain mengenai sampel. Sinar yang diteruskan kemudian masing-masing difokuskan ke detektor yang mengukur rasio intensitas dari dua sinar dan perbedaan secara otomatis dikonversi dan diplot sebagai absorbansi.



Gambar 39. Konfigurasi pengaturan sistem *double beam – double detector* dari spektrofotometer seri UV-1600, UV-1700 dan UV-1800 dari Shimadzu. Gambar diperoleh dan dengan ijin dari Shimadzu Asia Pacific Pte. Ltd. melalui PT. Ditek Jaya.

Sifat spektroskopis uv-tampak dari klorofil

Klorofil adalah pigmen utama pada tumbuhan, alga serta cyanobakteria. Klorofil merupakan komponen penting dalam penyerapan cahaya, penghantar energi dan proses penyimpanan energi yang berlangsung pada organisme fotosintesis. Klorofil juga berperan dalam reaksi transfer elektron pada kompleks pusat reaksi yang nantinya berperan dalam produksi potensial listrik transmembran. Potensial listrik tersebut nantinya akan mendorong gradien proton yang merupakan tulang punggung proses pertumbuhan organisme.



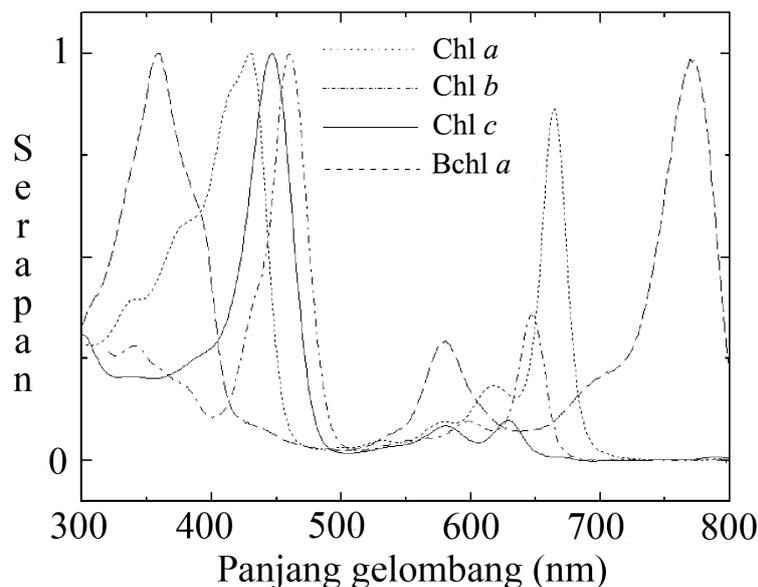
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Chl <i>a</i>	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	H	COOCH ₃	PHY	H
Chl <i>b</i>	C ₂ H ₃	CHO	C ₂ H ₅	H	COOCH ₃	PHY	H
Chl <i>c</i>	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	COOCH ₃	H	H	CH ₃
Chl <i>d</i>	CHO	CH ₃	C ₂ H ₅	H	COOCH ₃	PHY	H
BChl <i>a</i>	COCH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	COOCH ₃	H	PHY	CH ₃
BChl <i>b</i>	COCH ₃	H	CHCH ₃	COOCH ₃	H	PHY	CH ₃

BChl <i>c</i>	C(CH ₃)OH	CH ₃	variable	H	H	FARN	CH ₃
---------------	-----------------------	-----------------	----------	---	---	------	-----------------

Struktur yang ditampilkan diatas adalah cincin jenis klorin. Cincin jenis porfirin memiliki ikatan rangkap pada C₁₇ dan C₁₈. Sedangkan cincin jenis bakterioklorin memiliki ikatan tunggal antara C₇ dan C₈. PHY adalah gugus fitol. FARN adalah gugus farnesil.

Gambar 40. Struktur molekul beberapa klorofil dan bakterioklorofil. Tanda panah menunjukkan momen dipol Q_x dan Q_y .

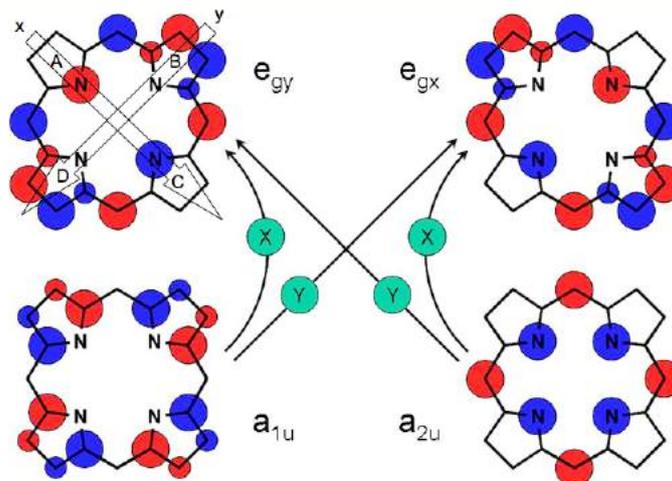
Saat ini telah teridentifikasi sejumlah seratus jenis klorofil di alam dan semuanya memiliki struktur dasar kimia tetrapyrrole (Gambar 40). Hampir semua klorofil memiliki ion Mg^{+2} yang terkoordinasi dengan empat nitrogen pada pusat makrosiklik tetrapyrrole. Di dalam kompleks protein-pigmen, Mg berikatan penta-koordinasi secara non-kovalen dengan residu asam amino dari protein. Kromofor dari klorofil memiliki pita serapan tertentu pada daerah ultraviolet-tampak-dekat inframerah (UV-Vis-NIR) yang intensitas dan posisi tepatnya bergantung pada struktur π -elektron ikatan rangkap terkonjugasi pada tetrapyrrole serta gugus tambahan pada periferal. Sebagai contohnya molekul klorofil c (Chl c). Chl c dapat ditemukan di beberapa alga dan bakteri fotosintesis. Chl c berstruktur kimia porfirin dan memiliki pita serapan yang kuat pada panjang gelombang rendah dan pita serapan yang lemah di daerah jingga-merah (Gambar 40). Serapan pada energi yang tinggi secara kolektif dinamakan pita Soret atau pita-B, sedangkan serapan pada energi yang lebih rendah disebut pita-Q. Berkurangnya satu ikatan rangkap periferal pada porfirin akan membentuk kromofor baru seperti klorin. Hal ini mengakibatkan simetri pada kromofor akan berkurang, sedemikian sehingga pita Q terpecah menjadi dua pita yang tampak pada spektrum absorpsi. Kedua pita ini dinamakan Q_x dan Q_y .



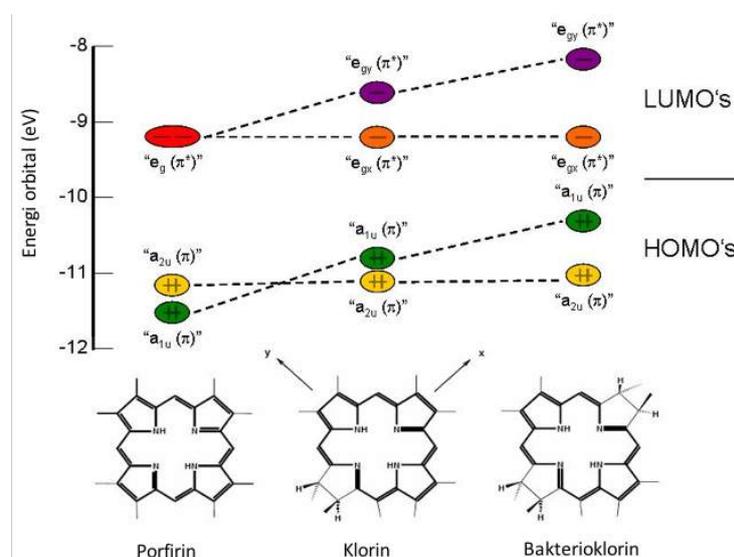
Gambar 41. Contoh spektra serapan klorofil (Chl) a, b, c dan bakterioklorofil (Bchl) a dalam pelarut organik. Spektra telah dinormalisasikan pada puncak pita Soret.

Molekul yang memiliki struktur dasar klorin seperti klorofil a dan b (Gambar 41) memiliki pita Q_y yang cukup kuat serapannya, hampir setara dengan pita Soret (Gambar 41). Berkurangnya satu ikatan rangkap pada klorin akan menghasilkan cincin bakterioklorin. Perubahan struktural pada makrosiklis ini menyebabkan pita Soret terpecah dan bergerak menuju ke daerah ultraviolet antara 320 dan 400 nm. Sedangkan pita Q_x dan Q_y akan terpisah secara jelas. Pita Q_y pada bakterioklorin terletak pada panjang gelombang 700 nm atau lebih, menuju ke daerah dekat inframerah (NIR) (Gambar 41). Melalui proses perubahan struktur ini golongan klorofil mampu untuk menyerap energi cahaya pada panjang gelombang yang cukup lebar dan dapat beradaptasi terhadap lingkungan dimana organisme fotosintesis berada.

Karena klorofil a, b dan c adalah turunan porfirin, karakteristik utama spektrum optiknya dapat dipahami dalam hal teori 4-orbital Goutermann, teori perturbasi porfirin (Gouterman, 1978, Weiss, 1972). Model ini (Gambar 42) dikembangkan untuk simetri tinggi dari metallo-porphyrins (simetri D_{4h}) dan, kemudian diterapkan, dengan sedikit modifikasi, untuk struktur klorin dan bakterioklorin. Orbital tertinggi molekul yang terisi (HOMO) terdiri dari orbital $a_{2u}(\pi)$ dan $a_{1u}(\pi)$ dan orbital terendah molekul tak terisi (LUMO) terdiri dari orbital $e_{gx}(\pi^*)$ dan $e_{gy}(\pi^*)$. Ada 4 kemungkinan transisi (Gambar 42), yaitu transisi terpolarisasi pada sumbu-x [$a_{1u}(\pi) \rightarrow e_{gy}(\pi^*)$ dan $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_{gx}(\pi^*)$], dan transisi terpolarisasi pada sumbu-y [$a_{1u}(\pi) \rightarrow e_{gx}(\pi^*)$ dan $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_{gy}(\pi^*)$]. Simbol x dan y mengacu pada sumbu yang melalui cincin B-D dan A-C (Gambar 40). Nomenklatur dari transisi elektronik utama adalah B (Soret) untuk transisi energi tinggi $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_{gy}(\pi^*)$ dilambangkan sebagai B_y dan $a_{1u}(\pi) \rightarrow e_{gy}(\pi^*)$ dilambangkan sebagai B_x , sedangkan simbol Q untuk transisi berenergi rendah $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_{gx}(\pi^*)$ dilambangkan sebagai Q_x dan $a_{1u}(\pi) \rightarrow e_{gx}(\pi^*)$ dilambangkan sebagai Q_y .



Gambar 42. Pola orbital terluar dari porfirin menurut model 4-orbital Gouterman ditunjukkan dalam warna. Orbital-orbital e_{gx} dan e_{gy} : LUMO; a_{2u} and a_{1u} : HOMO; klasifikasi menurut simetri D_{4h} . Di sini fase yang berbeda dari orbital p ditampilkan dalam warna merah (+) dan biru (-). Panah besar menunjukkan sumbu x dan y.



Gambar 43. Skema energi dari orbital molekul untuk porfirin, klorin dan bakterioklorin

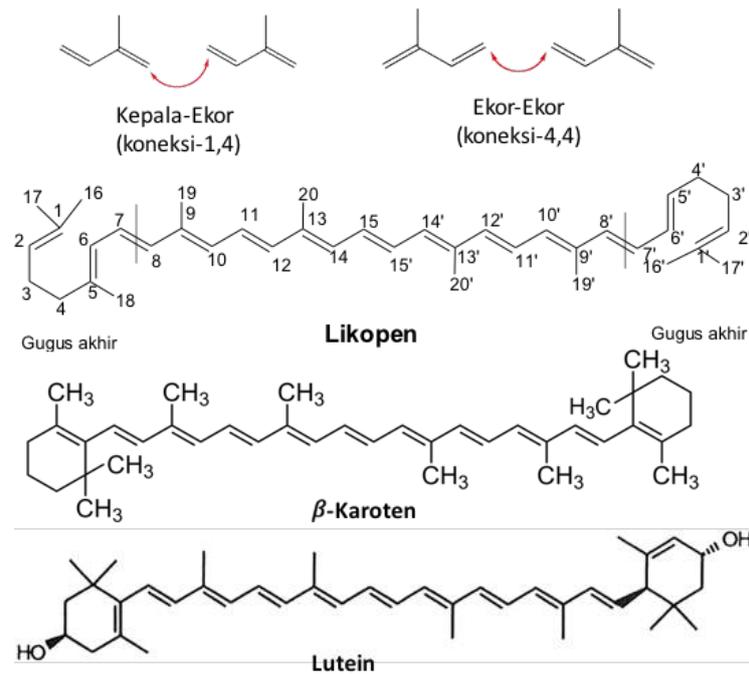
Ketika pirol cincin B dan / atau D dari porfirin jenuh (Gambar 43), energi orbital $a_{1u} (\pi)$ dan $e_{gy} (\pi)$ meningkat, sedangkan orbital $a_{2u} (\pi)$ dan $e_{gx} (\pi^*)$ tetap tidak terpengaruh. Akibatnya, celah energi antara a_{1u} HOMO dan e_{gx} LUMO menjadi lebih kecil, band Q_y bergeser ke merah dan memperoleh kekuatan osilator (Hanson, 1988). Tentu saja, simetri D_{4h} rusak oleh kejenuhan satu atau dua dari cincin pirol dan, oleh karena itu transisi terpolarisasi sumbu-x akan memiliki energi yang jauh lebih tinggi daripada transisi terpolarisasi sumbu-y. Perubahan karena pengurangan makrosiklik porfirin di C-17, C-18 di klorin (650-680 nm), dan tambahan pada C-7 dan C-8 di bakterioklorin (750-800nm) dapat dilihat dengan jelas sebagai pergeseran batokromik dari pita serapan berenergi terendah, seperti yang terlihat di Gambar 43, dimana klorofil c yang memiliki struktur dasar cincin porfirin, klorofil a dan b yang memiliki struktur dasar cincin klorin, dan bakterioklorofil a yang memiliki struktur dasar cincin bakterioklorin.

Sifat spektroskopis uv-tampak dari karotenoid

Secara struktur, karotenoid adalah isoprenoid poliena yang dibentuk oleh penggabungan delapan C5 unit-unit isoprena. Unit-unit isoprena tersebut bergabung dengan ikatan “kepala-ekor”, kecuali pada bagian tengah molekul isoprena, merupakan ikatan “ekor-ekor,” sehingga molekul karotenoid menjadi simetris (Gambar 44). Kedua gugus metil yang dekat dengan pusat rantai poliena dipisahkan oleh 6 atom C, sedangkan gugus metil lainnya dipisahkan oleh 4 atom C. Dari struktur dasarnya, hampir semua karotenoid dapat terbentuk secara normal melalui proses hidrogenasi, siklisasi, oksidasi atau kombinasi dari proses-proses tersebut. Menurut Karrer, penomoran molekul dari ujung ke tengah adalah 1 sampai 15, untuk kelompok metil tambahan adalah 16 sampai 20 dan untuk bagian yang simetris adalah 1 sampai 20. Aturan sebelumnya yang dibuat oleh Karrer telah dilengkapi oleh IUPAC.

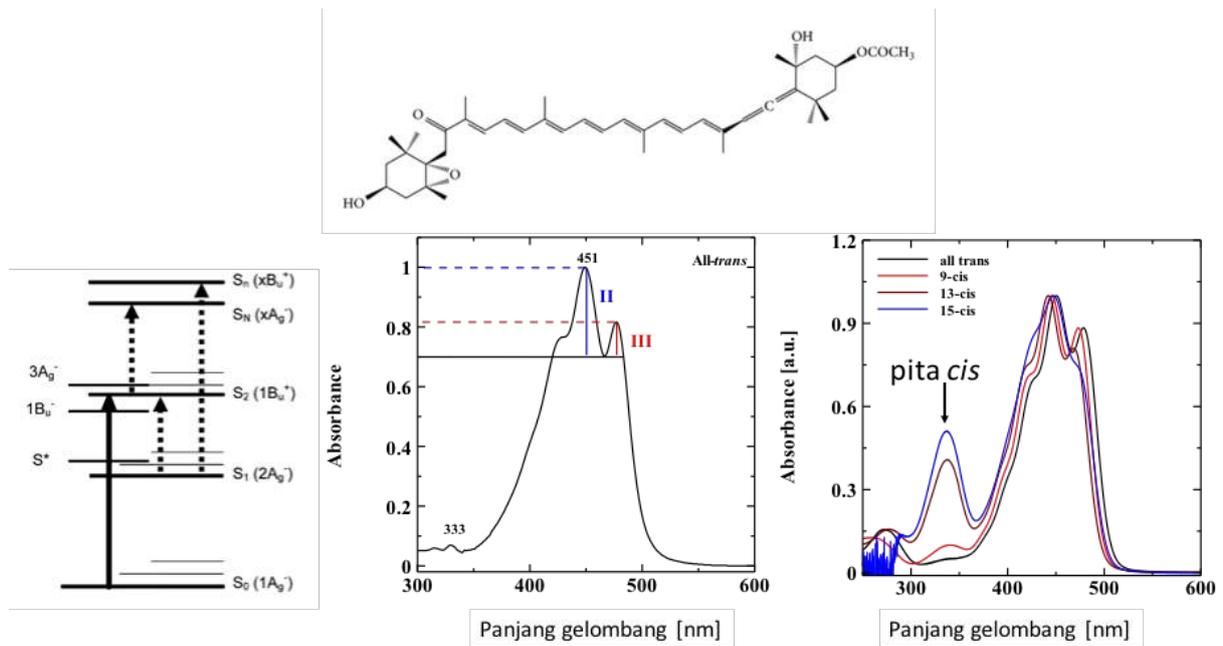
Pembahasan berikut menggunakan nama-nama biasa, dimana karotenoid yang sangat dikenal telah ditetapkan, biasanya diperoleh dari sumber dimana mereka pertama kali diisolasi. Nama-nama ini dilengkapi dengan nama-nama semisistematik yang lebih baru, yang diperoleh dari nama asalnya karoten. Nama hidrokarbon karotenoid yang khusus dibuat dari dua huruf Yunani sebagai prefik (awalan) dari nama asalnya. Awalan-awalan ini merupakan karakteristik dari dua kelompok akhir C_9 : asiklik (ψ), skloheksana (β , ϵ), siklopentana (κ).

Karotenoid jenisnya sangat banyak sekali, sudah ditemukan lebih dari 600 jenis karotenoid. Berdasarkan struktur kimianya karotenoid terbagi menjadi 2 golongan besar, yaitu golongan karoten dan xantofil. Golongan karoten merupakan kelompok hidrokarbon rantai jenuh ($C_{40}H_{56}$), yang bersifat non polar. Jenis-jenis karotenoid yang termasuk dalam golongan ini misalnya α -karoten, β -karoten, λ -karoten dan lain-lain. Xantofil adalah kelompok golongan karoten teroksidasi dan bersifat lebih polar dibandingkan karoten (Gambar 44). Beberapa jenis karotenoid yang termasuk dalam golongan ini misalnya likopen, lutein, zeaxantin, astaxantin dan lain-lain.

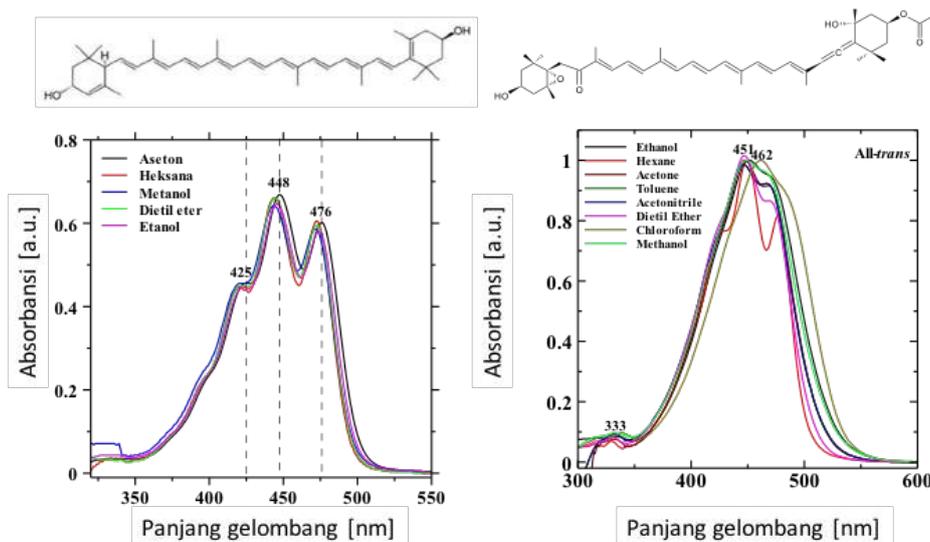


Gambar 44. Struktur isoprenoid, sistem penggabungannya, serta beberapa contoh golongan karotenoid.

Sifat spektroskopi karotenoid dapat ditelusuri ke sifat elektronik dari sistem elektron- π terkonjugasinya. Jumlah ikatan C=C terkonjugasi dalam karotenoid yang terjadi secara alami berkisar dari 3 (misalnya fitoen) hingga 13 (misalnya spiriloksantin). Keadaan tereksitasi karotenoid diklasifikasikan menurut kelompok simetri titik C_{2h} . Dalam kelompok simetri C_{2h} , transisi $S_0 \rightarrow S_1$ dari keadaan dasar $1A_g^-$ ke keadaan elektronik terendah $2A_g^-$ adalah terlarang secara optis (Schulten et al., 1972, Tavan et al., 1986). Penyerapan optik utama karena itu timbul dari transisi $S_0 \rightarrow S_2$ yang diijinkan, dari keadaan dasar $1A_g^-$ ke keadaan $1B_u^+$. Keadaan-keadaan ini umumnya dibagi menjadi beberapa transisi vibrasi, menghasilkan serangkaian tiga pita penyerapan berjarak dekat (Gambar 45). Spektrum penyerapan dari isomer *cis* menimbulkan puncak tambahan pada ultraviolet (pita *cis*). Umumnya, itu terletak 143 nm dari panjang gelombang maksimum (contohnya $473 - 143 = 330$ nm). Umumnya, serapan maksimal dari isomer *cis* mengalami suatu pergeseran hipsokromik 2 nm sampai 5 nm, dan absorbansinya menurun (hipokromik). Akibatnya, isomer *cis* mempunyai warna-warna dengan intensitas lebih rendah dari pada isomer *trans*-nya. Karotenoid dengan gugus fungsi tertentu dapat menunjukkan karakteristik optik yang berbeda dalam berbagai pelarut, tergantung pada polarisabilitas pelarut (Gambar 46) (Frank, 1993, Kuki et al., 1994, Nagae et al., 1994).



Gambar 45. Ciri khas karotenoid dengan simetri kelompok titik C_{2h} dimana transisi $S_0 \rightarrow S_2$ yang diijinkan, serta contoh spektrum dari fukosantin dalam heksan yang menunjukkan struktur halus tiga jari dan spektra isomerisasi fukosantin yang terlihat pada pita cis.



Gambar 46. Spektra lutein dan fukosantin dalam berbagai pelarut organik memperlihatkan dimana perbedaan gugus keton mempengaruhi struktur halus tiga jari.

Spektroskopi inframerah

Konsep dasar vibrasi

Prinsip-prinsip dibalik spektroskopi inframerah sama seperti yang telah dibahas dalam spektroskopi absorpsi uv-tampak, kecuali bahwa saat ini rentang energi berada di wilayah inframerah yaitu energi yang diperlukan untuk menyebabkan **eksitasi vibrasi** ikatan dalam suatu molekul (kita akan mengasumsikan banyak dari apa yang sudah tercakup) dan hanya mengubahnya seperlunya untuk teknik ini). Terdapat dua jenis eksitasi ikatan yang dapat terjadi adalah vibrasi **peregangan** atau *stretching* (energi yang lebih tinggi) dan **tekukan** atau *bending* (energi rendah).

Seringkali, penyerapan panjang gelombang tertentu dari radiasi inframerah dapat dikorelasikan dengan pembengkokan atau peregangan dari jenis ikatan tertentu dalam suatu molekul. Namun, harus diingat bahwa setiap eksitasi vibrasi tunggal tidak dapat dipertimbangkan secara terpisah dari bagian lain dari molekul. Spektrum inframerah dari molekul organik biasanya dipersulit oleh osilasi ikatan di seluruh molekul yang mempengaruhi penyerapan radiasi insiden dan menimbulkan *overtones* dan harmonik. Oleh karena itu, selain mengamati absorpsi karena eksitasi vibrasi ikatan individu, eksitasi vibrasi molekul juga perlu diamati.

Frekuensi vibrasi dapat dihitung dengan presisi dengan menggunakan model “bola dan pegas” sederhana dan menerapkan Hukum Hooke untuk menghubungkan frekuensi dengan kekuatan ikatan dan massa atom:

$$v = k \sqrt{\frac{\text{kekuatan ikatan}}{\text{massa}}} \quad (3.5)$$

yang kemudian menjadi:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\left[\frac{m_1 m_2}{(m_1 + m_2)}\right]}} \quad (3.6)$$

dimana v adalah frekuensi vibrasi, k adalah konstanta gaya dari ikatan, m_1 dan m_2 adalah massa kedua atom yang ada.

Namun demikian, mengingat bahwa kimiawan menggunakan analisis spektroskopi inframerah dengan cara yang sangat empiris, sehingga tidak perlu melakukan perhitungan tersebut. Sebaliknya, dengan memahami hubungan pada rumus di atas, kita harus ingat pedoman kualitatif bahwa frekuensi vibrasi meningkat ketika kekuatan ikatan meningkat dan ketika massa berkurang. Dari ini, kesimpulan berikut dapat diambil:

1. Peregangan ikatan membutuhkan lebih banyak energi daripada tekukan ikatan dan oleh karena itu absorpsi peregangan ikatan akan membutuhkan radiasi panjang gelombang yang lebih pendek (frekuensi yang lebih tinggi) daripada absorpsi tekukan ikatan.
2. Sistem ikatan ganda dan rangkap tiga membutuhkan energi yang semakin tinggi untuk eksitasi vibrasi. Oleh karena itu, baik dalam mode peregangan dan lentur, $C \equiv C$ menyerap radiasi frekuensi lebih tinggi daripada $C=C$, yang pada gilirannya menyerap radiasi frekuensi lebih tinggi daripada $C-C$.
3. Semakin kecil massa sistem tereduksi, semakin besar energi yang dibutuhkan untuk menyebabkan eksitasi vibrasi dan semakin tinggi frekuensi radiasi yang diperlukan. Oleh karena itu peregangan $O-H$ dan $C-H$ terjadi pada frekuensi yang lebih tinggi daripada $C-O > C-C$. Demikian pula peregangan $O-H$ harus terjadi pada frekuensi yang lebih tinggi daripada peregangan $O-D$.

Namun, ini adalah sesuatu dari penyederhanaan dimana elektronegativitas relatif dari dua atom konstituen (dan karenanya polarisasi dari ikatan) juga berpengaruh dalam menentukan frekuensi absorpsi keseluruhan. Sebagai contoh, peregangan $C-H$ harus terjadi pada frekuensi yang lebih tinggi daripada $O-H$ yang membentang berdasarkan massa yang berkurang, tetapi sebenarnya ini adalah kebalikannya, karena polarisasi ikatan $O-H$ lebih besar dibandingkan dengan hasil ikatan $C-H$ menghasilkan konstanta gaya yang lebih besar untuk ikatan.

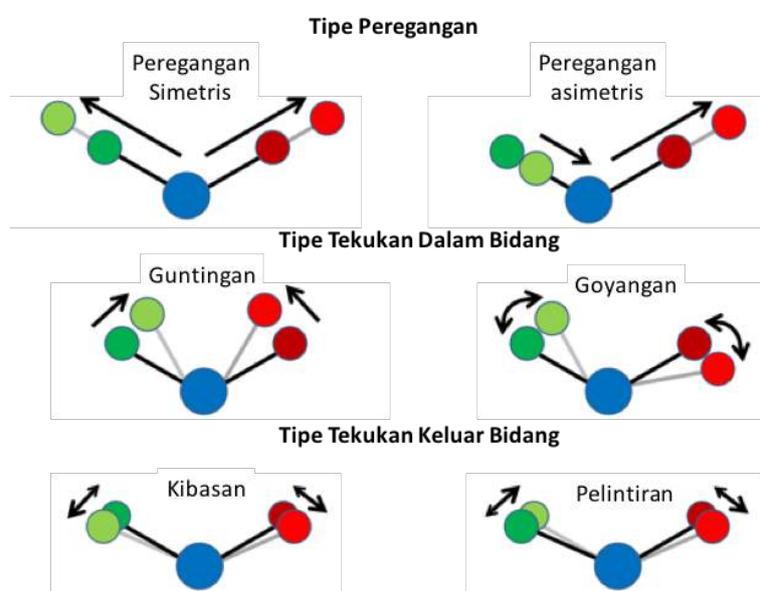
Tipe eksitasi vibrasi

Molekul dengan susunan non-linear dari atom konstituen n memiliki mode vibrasi dasar $(3n - 6)$. Jadi metana memiliki 9 mode getaran yang berbeda, etana 18 dan seterusnya. Namun, beberapa mode vibrasi ini dapat mengalami **degenerasi**, yaitu memiliki energi yang sama, dan karena itu menyerap radiasi

pada frekuensi yang sama. Selain itu, penyerapan inframerah hanya diamati jika getaran membentuk dipol yang berfluktuasi dan oleh karena itu mode vibrasi simetris tidak diamati dalam spektrum IR; meskipun deformasi simetri secara teoritis masih dapat diamati sebagai absorpsi lemah karena deformasi molekul.

Selain **frekuensi-frekuensi fundamental** ini, absorpsi yang dimodulasi oleh molekul-molekul lainnya umumnya diamati. **Pita overtone** dapat diamati pada beberapa vibrasi dasar (terutama yang kuat) dan dua frekuensi dasar dapat digabungkan baik dalam cara aditif atau subtraktif untuk memberikan **ketukan** yang terjadi pada frekuensi **kombinasi** atau **perbedaan**.

Terbukti, bahkan molekul berukuran sedang memiliki sejumlah besar mode vibrasi potensial dan ini berkontribusi pada kerumitan spektrum IR. Untuk unit XY_2 (misalnya CH_2 , NH_2), mode peregangan dapat berupa **simetris** atau **antisimetris**. Sedangkan mode tekuk terdapat beberapa jenis seperti **guntingan**, **goyangan**, **kibasan**, dan **pelintiran**. Jelas mode getaran simetris seperti peregangan simetris dan guntingan hanya akan menimbulkan lemah serapan IR.



Gambar 47. Diagram mode vibrasi pada molekul XY_2 .

Satuan pengukuran

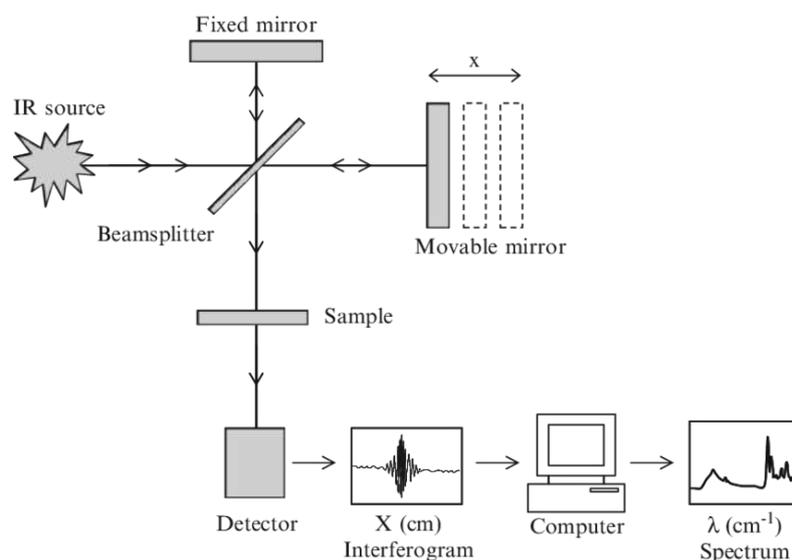
Posisi penyerapan dalam spektroskopi inframerah yang digunakan untuk dicatat sebagai panjang gelombang ν μm dan skala panjang gelombang masih biasanya ditampilkan pada semua grafik spektrum IR. Daerah pada kisaran 2,5–25 μm (wilayah tengah-inframerah) menjadi wilayah yang menjadi fokus analisis. Namun, saat ini satuan tersebut diganti dengan **bilangan gelombang** atau *wavenumber*. Bilangan gelombang sama dengan jumlah panjang gelombang per cm (satuan ini disebut sebagai sentimeter timbal balik, cm^{-1}) dan rentang frekuensi di atas sesuai dengan 4000–400 cm^{-1} . Umumnya kimiawan salah menyebut “frekuensi” X cm^{-1} , daripada menyebut dengan benar tentang bilangan gelombang X cm^{-1} dan anda tidak boleh bingung dengan jargon tersebut.

Instrumentasi spektrometer inframerah

Prinsip operasi dari spektrometer sinar ganda IR sama dengan spektrometer sinar ganda uv-tampak. Meskipun demikian, resolusi yang lebih tinggi dengan IR membutuhkan optik lebih halus. Sumber radiasi adalah filamen yang dipanaskan secara elektrik. Ini biasanya berupa filamen Nernst (campuran Zr, Th dan Ce oksida) atau Globar (silikon karbida). Menggunakan optik cermin sinar dibagi menjadi dua. Satu sinar melewati sampel, dan yang lainnya melalui referensi - meskipun untuk jenis sampel tertentu tidak ada referensi yang digunakan. Setelah melewati sampel dan referensi sinar alternatif dilewatkan melalui monokromator dan kemudian sinar sampai di detektor.

Spektrum dicatat di atas rentang yang sama $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ ($2,5\text{--}25\text{ }\mu\text{m}$) dan biasanya dibagi menjadi dua bagian linier dari $4000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ dan $2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, rentang yang terakhir diperluas dibanding yang pertama. Sumbu vertikal dikalibrasi sebagai persentase sinar yang ditransmisikan, 100% artinya tidak ada penyerapan dan 0% artinya penyerapan total.

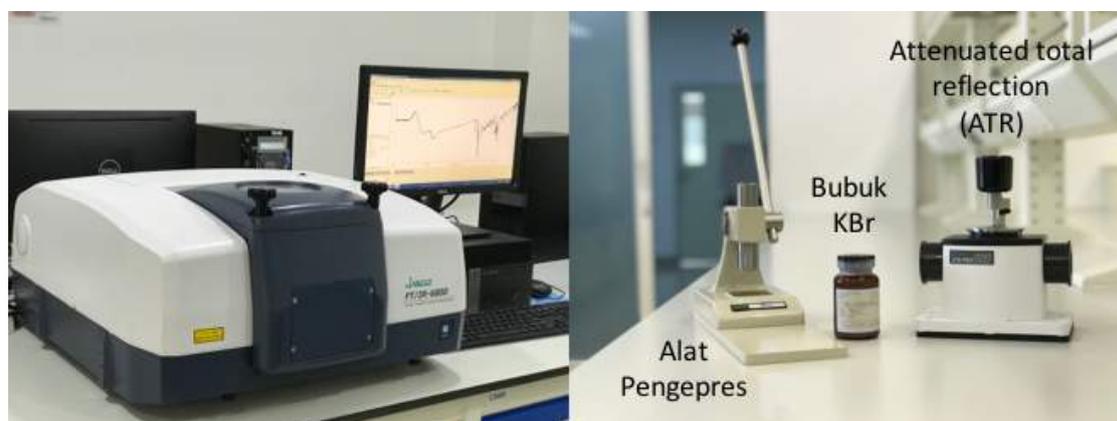
Spektrometer IR saat ini menggunakan transformasi Fourier. Radiasi IR, dalam bentuk **interferogram** frekuensi yang kompleks dilewatkan melalui sampel, dideteksi dan kemudian diarahkan untuk transformasi Fourier.



Gambar 48. Gambar skematis spektrometer IR dengan transformasi Fourier.

Persiapan sampel

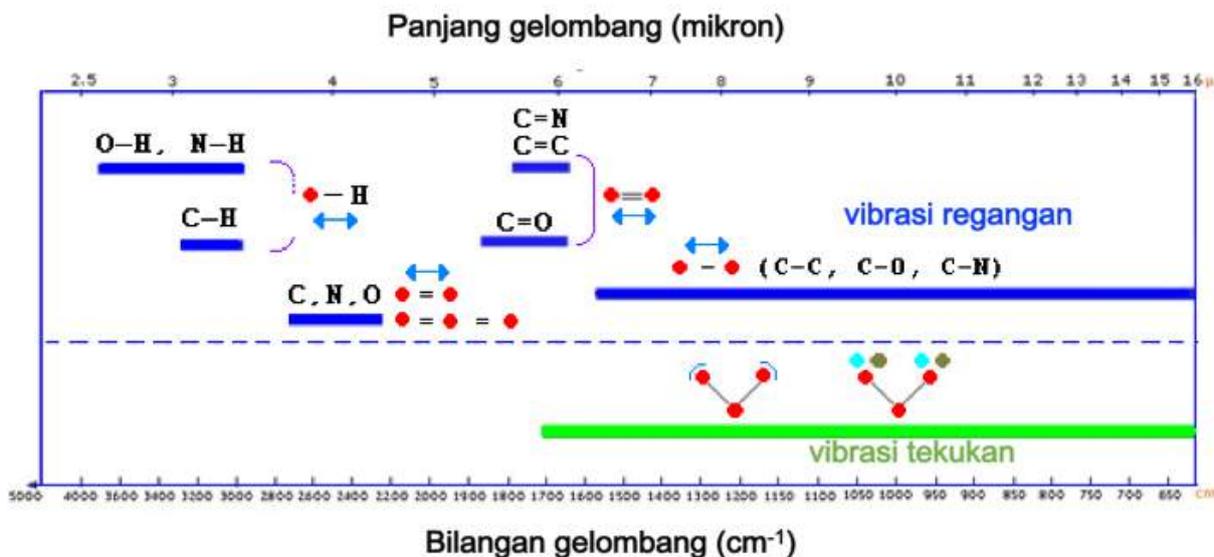
Oleh karena tidak ada pelarut yang sama sekali transparan terhadap sinar inframerah, maka cuplikan dapat diukur sebagai padatan atau cairan murninya. Cuplikan padat digerus dalam mortir kecil bersama kristal KBr kering dalam jumlah sedikit sekali ($0,5\text{--}2\text{ mg}$ cuplikan ditambah 100 mg KBr kering). Campuran tersebut dipres dengan alat pengepres menghasilkan tablet cuplikan tipis yang kemudian diletakkan di tempat sel spektrofotometer inframerah dengan lubang mengarah ke sumber radiasi. Sedangkan sampel berupa cairan dapat menggunakan *attenuated total reflection* (ATR) seperti pada Gambar 49.



Gambar 49. Spektrometer FT-IR dan asesorisnya berupa alat pengepres untuk membuat tablet cuplikan dengan bubuk KBr dan *attenuated total reflection* (ATR) untuk sampel cair. Spektrometer Jasco FT/IR-6800 digunakan dalam praktikum kimia analitik instrumentasi mahasiswa S1 program studi kimia, Universitas Ma Chung.

Analisis spektrum IR

Secara garis besar spektrum dapat dibagi menjadi tiga wilayah, 4000-2000, 2000-1500, 1500-600 cm^{-1} (yang belakangan sering disebut sebagai **wilayah sidik jari**). Data yang paling dapat diinterpretasikan terdapat di dua wilayah pertama. Daerah sidik jari mengandung pencerapan karena getaran molekul senyawa dan analisa yang ketat di wilayah ini tidak mungkin. Wilayah 4000–1500 cm^{-1} mengandung vibrasi peregangan.



Gambar 50. Daerah serapan IR dari gugus-gugus fungsional yang umum

Dalam semua analisis pola yang diikuti pada dasarnya sama:

1. Periksa spektrum mulai dari bilangan gelombang tinggi (4000 cm^{-1}).
2. Perhatikan serapan terkuat dan coba kaitkan dengan mereka dengan tabel/gambar intepretasi (Gambar 44).
3. Perhatikan tidak adanya puncak di area penting.
4. Jangan mencoba mengkorelasikan semua puncak, terutama di wilayah sidik jari.

Diperlukan waktu untuk mempelajari bahkan kisaran data korelasi yang moderat tetapi Anda harus berusaha untuk menghafal tabel singkat dalam Lampiran yang berisi kelompok fungsi penyerapan yang paling penting yang dikelompokkan menurut bilangan serap penyerapan. Perhatikan bahwa semua posisi penyerapan yang dikutip adalah perkiraan.

Pita utama yang nampak dalam spektra IR alkana disebabkan oleh regangan C–H di daerah 2850-3000 cm^{-1} , guntungan CH_2 dan CH_3 di daerah 1450-1470 cm^{-1} , goyangan CH_3 pada kurang lebih 1370-1380 cm^{-1} dan pita goyangan, pada 720-7725 cm^{-1} . Pita- pita ini tidak dapat dijadikan patokan karena kebanyakan alkana mengandung gugus-gugus ini.

Vibrasi regangan C–H alkana terjadi pada panjang gelombang yang lebih pendek daripada C–H alkana. Ingat bahwa ikatan karbon-hidrogen alkana mempunyai sifat lebih kuat daripada ikatan karbon-hidrogen alkana. Makin kuat ikatan, makin sukar bervibrasi dan memerlukan energi yang lebih tinggi. Jadi alkana yang mempunyai paling sedikit satu hidrogen menempel pada ikatan rangkap dua biasanya mengabsorpsi di daerah 3050-3150 cm^{-1} (Gambar 50).

Bentuk regangan C=C alkana terjadi di daerah 1645-1670 cm^{-1} . pita ini sangat jelas bila hanya satu gugus alkil menempel pada ikatan rangkap dua. Semakin banyak gugus alkil yang menempel, intensitas absorpsi berkurang karena vibrasi terjadi dengan perubahan momen dipol yang lebih kecil. Untuk

alkena-alkena trisubstitusi, tetrasubstitusi C=C sering mempunyai intensitas yang rendah atau tidak teramati.

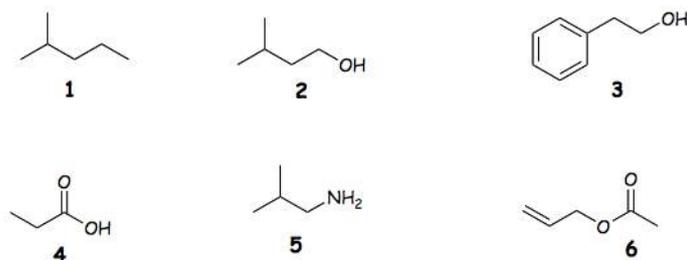
Alkuna ujung memperlihatkan pita regangan C–H yang tajam pada 3300-3320 cm^{-1} dan bentuk bending C–H yang jelas pada 600-700 cm^{-1} . Regangan C=N pada alkuna ujung nampak pada 2100-2140 cm^{-1} dengan intensitas sedang (Gambar 50) untuk regangan C=C alkuna dalam berupa pita lemah yang terjadi pada 2200-2260 cm^{-1} .

Alkohol dan eter mempunyai ciri absorpsi infra merah karena regangan C–O didaerah 1050-1200 cm^{-1} . oleh karena pita-pita ini terjadi di daerah spektrum dimana biasanya terdapat banyak pita lain, maka pita-pita tersebut tidak bermanfaat untuk diagnosis. Akan tetapi regangan O–H alkohol, yang terjadi di daerah 3200-3600 cm^{-1} , lebih berguna.

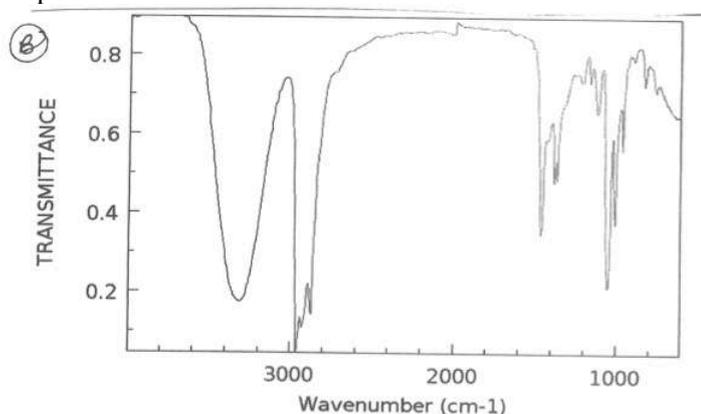
Soal-soal pertanyaan

1. Berikan penjelasan definisi yang dimaksud oleh kata kunci berikut: (a) spektrofotometer, (b) instrumen sinar ganda, (c) kromofor, (d) keadaan eksitasi, (e) pergeseran batokromik, (f) transisi vibrasi, (g) degenerasi.
2. Berikan penjelasan mengapa suatu transisi elektronik dapat diijinkan atau terlarang?
3. Sebutkan jenis-jenis vibrasi ikatan yang terjadi pada molekul XY_2 ketika berinteraksi dengan inframerah!
4. Informasi apakah yang didapatkan dari daerah sidik jari pada spektrum IR?
5. Berapakah konsentrasi klorofil *a* awal dalam 1,5 mL aseton 100% dengan koefisien ekstinsi pada panjang gelombang 662.7 nm sebesar $78,75 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, apabila didapatkan pengukuran spektrum uv-tampak dari sampel setelah 80% pengenceran sebesar 0,6 [a.u.] dengan kuvet 1.0 cm?
6. Apabila empat molekul isoprenoid bergabung 4 menghasilkan retinol, maka apakah yang terjadi dengan spektrumnya? Jelaskan mengapa anda memiliki ekspektasi tersebut?
7. Anda diberikan data spektrum IR salah satu dari enam senyawa dengan struktur molekul seperti dibawah. Berikan analisa determinasi anda terhadap spektrum tersebut dan cocokanlah spektrum tersebut dengan senyawa yang tepat.

Struktur ke-enam senyawa:



Data spektrum IR:



BAB 4 Metode analitik klorofil

Metode analitik pigmen klorofil telah lama dikembangkan dan kemudian pertama kali disarikan salah satunya dalam buku “Modern Methods of Plant Analysis”, yang berisi tentang analisis klorofil pada bahan tanaman karya Smith dan Benitez (1955), dimana metode tersebut merupakan yang paling baik pada saat itu. Inti sari buku tersebut selanjutnya ditinjau kembali oleh Holden (1965a) serta Strain dan Svec (1966). Pengukuran klorofil *a* atau terkadang klorofil total digunakan secara rutin sebagai dasar perhitungan laju fotosintesis dan respirasi, biomasa metabolisme aktif dan produktivitas ekosistem terestrial dan akuatik juga dikembangkan (Šesták, 1971). Secara khusus analisis berbagai klorofil dari sampel fitoplanton dan lapisan alga dikembangkan dan memberikan informasi berarti terkait tipe organisme fotosintesis dalam komunitas alga (Jeffrey and Allen, 1967, Zapata et al., 2004). Hingga saat ini metode perhitungan yang umum digunakan untuk determinasi klorofil *a*, *b*, *c*, dan *d*, serta total klorofil telah dikembangkan untuk aseton 90%, metanol 100% dan pelarut etanol dengan menggunakan larutan penyangga pH untuk mengestimasi klorofil dalam ekstrak alga.

Survei literatur tentang metode yang berkembang selama 10 tahun terakhir menunjukkan belum adanya pengurangan perhatian peneliti tentang metode pemisahan dan penentuan klorofil berserta produk-produk degradasinya. Para ahli biokimia, kimia bahan alam, fisiologi tanaman, teknologi makanan dan kelautan melanjutkan penelitian untuk menemukan dan mendapatkan metode yang cocok terutama untuk bahan baku yang mereka uji.

Pengumpulan dan penyimpanan bahan

Meskipun penggunaan bahan tanaman segar segera setelah diperoleh lebih baik dalam analisa penentuan klorofil, namun seringkali bahan tanaman tersebut harus disimpan terlebih dahulu sebelum dianalisis. Misalnya kalau peneliti mengambil bahan tersebut di daerah yang jauh dari laboratorium. Daun pada beberapa spesies tertentu, misalnya gula bit, dapat disimpan pada kotak polietilen di ruang gelap bersuhu 0 °C selama beberapa hari tanpa adanya tanda-tanda kerusakan klorofil, namun untuk sampel yang lain, misalnya rumput-rumputan, klorofil dapat rusak dengan cepat.

Wickliff dan Aronoff (1962) menganjurkan penyimpanan sampel dalam nitrogen cair. Penyimpanan pada suhu -20 °C sampai -30 °C cukup memadai untuk sebagian besar bahan tanaman yang tidak dapat dianalisis langsung. Kemungkinan lainnya, bahan tanaman disimpan dalam pelarut yang akan dipergunakan untuk ekstraksi pigmen. Friend (1960) menyimpan daun gandum dengan memotongnya hingga berukuran 1 cm, kemudian menyimpannya dalam pelarut aseton yang mengandung sedikit sodium askorbat pada suhu di bawah 0 °C. Di sini sodium askorbat berperan sebagai anti oksidan untuk memperkecil kemungkinan pigmen klorofil teroksidasi. Sedangkan metode meliputi pemanasan singkat dalam aseton sebelum penyimpanan dalam botol tertutup dalam almari pendingin.

Dahulu, determinasi klorofil biasa dilakukan pada sampel yang dikeringkan, baik dikeringkan dalam suhu ruang secara perlahan-lahan atau dengan menaikkan suhu sampai lebih dari 70 °C. Namun proses pengeringan dan suhu yang tinggi menjadikan metode penentuan sering menjadi tak berarti karena adanya perubahan ensimatis dan non-ensimatis yang memicu degradasi klorofil menuju pembentukan feofitin, feoforbid dan bermacam-macam senyawa coklat yang tak dikenal. Selain itu, untuk sampel yang telah dikeringkan ekstraksi pigmen musim tertentu menjadi lebih sulit dalam ekstraksi pigmen dibandingkan sampel segar, hal ini disebabkan matriks sampel telah mengalami perubahan yang ekstrim. Jika pada musim-musim tertentu, daun harus dikeringkan, lebih baik daun dikeringkan dalam oven hampa udara daripada dalam udara terbuka, namun alternatif terbaik dalam pengeringan sampel adalah dikeringbekukan (lyophilisasi) untuk menjaga kesegaran matriks sampel. Untuk melakukan hal ini, sampel berupa daun tanaman segar dibekukan cepat di dalam nitrogen cair dan kemudian dikeringbekukan di dalam alat freeze-dryer. Sampel yang telah dikeringbekukan dapat disimpan selama beberapa bulan pada -20 °C di tempat gelap tanpa adanya kerusakan klorofil. Penyimpanan lama seperti satu hingga lima tahun dapat dilakukan dengan menyimpan pada -80 °C.

Alga uniseluler dalam kelompok fitoplankton, dikumpulkan baik dengan cara pengendapan sel alga dengan sentrifugator berlaju rendah atau dengan penyaringan. Kemudian sel tersebut dapat disimpan beku seperti metode diatas sampai klorofil dapat ditentukan. Penyaring ester-selulosa (Milliopore) sering digunakan dan menjadi penyaring yang efektif karena laju, penyimpanan, dan kestabilannya. Namun penelitian sebelumnya menemukan bahwa penyaring tersebut dapat larut selama ekstraksi sehingga mengganggu proses pemisahan pigmen selama kromatografi, oleh karena itu beberapa peneliti lebih menyukai penyaring serabut kaca. Penambahan $MgCO_3$ sebelum penyaringan dianjurkan, namun pada metode lain ditemukan bahwa ketika klorofilid dan feoforbid yang adalah produk turunan klorofil terdapat dalam ekstrak, maka kedua pigmen tersebut diadsorpsi dengan kuat oleh $MgCO_3$ selama ekstraksi yang kemudian hilang dari ekstrak. Penyaring dapat disimpan selama beberapa minggu pada suhu $1\text{ }^\circ\text{C}$ atau kurang, dengan sedikit pigmen yang hilang, namun proses ekstraksi penyaring uap harus dilakukan secara cepat setelah proses penyaringan.

Penyiapan bahan

Dalam kasus penentuan pigmen berasal dari sumber bahan bakteri dan alga uniseluler tidaklah sulit membiakkannya, namun keterbatasan jumlah bahan mungkin yang menjadi tantangan pada beberapa organisme tersebut. Sedangkan organisme multiseluler menyajikan tantangan yang memperlihatkan keanekaragaman perkembangan, kecuali ketika tanaman ditumbuhkan dalam kondisi terkontrol, serta distribusi pigmen yang tidak merata pada organisme yang berbeda namun tetap pada organ yang sama. Apabila proses pengambilan sampel tidak dilakukan sebagaimana mestinya, hal itu akan sia-sia serta menghabiskan waktu dan usaha dalam melakukan penentuan klorofil dengan keakuratan yang tinggi.

Beragam cara telah dianjurkan untuk mengatasi kesulitan selama pengambilan sampel. Salah satunya adalah menjumlahkan daun yang terdapat pada tiap tanaman kemudian mengambil daun pada posisi yang tepat. Untuk daun yang berukuran besar, sampel dapat diambil dengan suatu sumbat bor pada sekumpulan daun yang disusun secara acak. Untuk sampel yang mengandung campuran daun, batang dan lain-lain dengan ukuran yang berbeda, bahan-bahan tersebut biasanya dipotong kecil-kecil kemudian dicampur sebelum penghilangan subsample untuk penentuan pigmen dan berat kering.

Perhitungan kandungan klorofil dapat diekspresikan berdasarkan berat basah, berat kering, luas daun atau dengan dasar mutlak pada tiap tanaman, daun atau sel (Bruinsma, 1963). Hal ini penting untuk mengekspresikannya baik dalam bentuk relatif dan mutlak atau perubahan signifikan yang mungkin tidak jelas. Sebagai contoh, ketika asam giberelat diaplikasikan pada tanaman kentang, jumlah klorofil tiap daun meningkat.

Ekstraksi pigmen

Suatu metode ekstraksi yang baik harus dapat mengangkat pigmen ke dalam larutan dengan sedikit atau tanpa perubahan di dalamnya. Berbagai macam metode telah digunakan namun hanya sedikit metode yang memberikan penjelasan penting. Ekstraksi klorofil a dan b dari jaringan tumbuhan tingkat tinggi telah diuraikan lengkap sejak lama. Beberapa peneliti mencelupkan bahan tanaman dalam air mendidih untuk menonaktifkan enzim dalam bahan sebelum ekstraksi dengan pelarut organik. Namun proses ini dapat menimbulkan isomerisasi klorofil a dan b sehingga terbentuk klorofil a' dan b' (Strain, 1954). Pendidihan juga menyebabkan kerusakan klorofil menjadi feofitin, yaitu dengan hilangnya atom magnesium, terutama jika jaringan tanaman bersifat agak asam.

Bagaimanapun juga, untuk mengekstrak protoklorofil(id), dan hal ini dapat dilakukan dengan pemanasan (Koski and Smith, 1948) yang memasukkan daun dalam air bersuhu $90\text{ }^\circ\text{C}$ selama 5 menit. Sebelum proses pemanasan, penelitian harus dilakukan dalam ruang gelap, karena tanaman dalam ruang bercahaya penuh selama kurang dari 1 menit mengakibatkan reduksi protopigmen. Banyak peneliti juga melakukan penelitian dalam ruang dengan cahaya hijau, yaitu rentang panjang gelombang cahaya dimana tidak diserap oleh klorofil.

Aseton dan methanol adalah pelarut yang sering digunakan untuk memecah ikatan pigmen-pigmen serta mengangkat klorofil ke dalam larutan. Karena bahan pengestraksi pigmen jaringan tumbuhan tingkat tinggi terbatas, namun untuk beberapa alga, nampaknya methanol lebih efektif. Walau demikian, Volk dan Bishop (1968) menemukan bahwa dimetil formamida lebih baik daripada methanol untuk mengekstraksi klorofil dan mutan Cyanidium (Volk and Bishop, 1968). Pelarut aseton lebih disukai oleh banyak peneliti karena rendahnya kemungkinan proses alomerisasi dalam methanol. Selain itu aseton dapat mendenaturasi protein yang mengikat klorofil dalam antena penangkap cahaya dan fotosistem. Namun demikian, penggunaan acetone sebaiknya tidak 100%, namun dicampur dengan pelarut lain yang bersifat basa misalnya amonium hidroksida atau dimetil sulfosida (DMSO) dengan perbandingan 9:1 (v/v), sehingga meminimalkan reaksi hilangnya ion logam magnesium pada klorofil pada kondisi asam. Beberapa peneliti mendukung penggunaan etanol dan ada pula yang selalu menggunakan campuran methanol dan petroleum eter (2:1, v/v). Campuran pelarut aseton-metanol (7:2, v/v) digunakan untuk ekstraksi bakterioklorofil (Cohen-Bazire et al., 1957). Pelarut-pelarut pada suhu ruang juga telah digunakan oleh banyak beberapa peneliti, namun umumnya hal ini tidak dianjurkan. Pelarut ekstraksi tersebut dianjurkan disimpan dingin pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, digunakan dengan cepat saat dipakai dan pada saat ekstraksi dianjurkan agar sampel tetap ditempatkan pada suhu $0-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ekstraksi pigmen dari alga laut dapat dibantu dengan membengkakkan sel-sel dalam air segar; teknik ekstraksi dari zooxanthellae diperbaiki dengan cara pendinginan singkat. Daley dkk (1973) membandingkan beberapa metode ekstraksi pigmen dari alga air tawar dan menemukan bahwa perusakan dinding sel dengan sonikasi adalah yang paling efisien (Daley et al., 1973).

Apabila sampel daun muda utuh disimpan dalam aseton atau methanol, klorofil dapat diekstraksi sempurna ke dalam pelarut, dengan cara demikian proses grinding sudah tidak diperlukan lagi. Walaupun demikian, jaringan multiseluler tanaman biasanya cukup keras sehingga tetap harus digrinder dalam mortar atau maseratoe berlaju tinggi. Untuk memastikan bahwa proses maserasi dilakukan dengan cepat, sebaiknya digunakan sejumlah kecil jaringan. Untuk hasil kuantitatif, jumlah maksimum yang dapat dikerjakan dengan cepat saat proses grinding dalam mortar adalah sekitar 2 gram berat basah, dan ketika menggunakan maserator, jumlahnya tidak lebih dari 10 gram. Untuk jaringan lembut yang sangat sedikit, dapat digunakan homogenizer kaca jenis piston tertutup. Untuk grinding dalam mortar, biasanya ditambahkan penggosok seperti pasir kuarsa. Dalam metode analisis AOAC (1995), jaringan digrinder sebelum pelarut ditambahkan. Dengan semaian leguminosae dan beberapa sereal yang memiliki aktifitas lipoksidase tinggi, proses seperti itu dapat memicu hilangnya klorofil sehingga tidak dapat teridentifikasi, serta kerusakan sampel (Holden, 1965), sehingga penting untuk memiliki konsentrasi pelarut yang tinggi sebelum memulai maserasi. Namun demikian, metode yang umum digunakan saat ini adalah ekstraksi dingin dan cepat yaitu dengan memasukan bola besi kecil dalam ependorf yang telah berisi sampel daun yang telah dikeringbekukan sehingga menjadi bubuk, kemudian pelarut ekstraksi dingin tersebut ditambahkan dan sampel di-vortex 2-3 kali dan kemudian "diinkubasi" dalam gelap pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (masuk dalam almari freezer) selama 20-30 menit. Konsentrasi akhir paling sedikit 80% aseton atau 9% methanol, penting untuk memastikan ekstraksi pigmen yang efisien dan untuk mencegah aktifitas klorofilase. Untuk ekstraksi pigmen dari alga plankton, dianjurkan menggunakan 90% aseton.

Hynninen dan Ellfolk (1973) membandingkan beberapa metode ekstraksi klorofil dari daun kacang kedelai dan menemukan bahwa metode konvensional selalu memicu terbentuknya produk-produk alomerisasi (Hynninen and Ellfolk, 1973). Namun demikian, mereka bekerja dengan bermacam-macam bahan tanaman, dan ketika melakukan ekstraksi aseton, daun digrinder sebelum penambahan pelarut dan memperhitungkan kandungan air di dalamnya. Metode yang akhirnya mereka pegunakan adalah ekstraksi dengan campuran pelarut petroleum eter-metanol-formamida (4:3:1, v/v).

Bahan-bahan kimia yang bersifat basa seperti CaCO_3 , MgCO_3 , NaHCO_3 , Na_2CO_3 , dan dimetilanilin biasanya ditambahkan untuk mencegah terbentuknya feofitin selama proses maserasi dan hal ini dianjurkan terutama untuk daun-daun yang bersifat asam. Feofitin adalah produk degradasi klorofil yang

terbentuk dari reaksi dengan asam dan kehadiran feofitin mengganggu selama penentuan konsentrasi total klorofil.

Sampel jaringan diekstrak dengan sedikit pelarut yang dituang dan dicampurkan, sampai tidak ada pigmen yang tersisa. Ekstrak pelarut dipisahkan dari residu dengan penyaringan menggunakan penyaring kaca. Residu pada penyaring dicuci dengan pelarut sampai filtrat mencapai volume yang dikehendaki. Untuk mendapatkan ekstrak yang jelas, kadang-kadang perlu menyaringnya lagi dengan lapisan kieselguhr. Saat ini pemisahan hasil ekstrak kasar dari jaringan dan matriks lain dari sel dilakukan dengan sentrifugasi dingin dengan laju maksimum sehingga jaringan dan matriks lain dari sel yang tidak diinginkan dapat diendapkan menjadi pelet dan ekstrak kasar klorofil berada sebagai supernatan.

Ekstrak seharusnya dianalisis secepat mungkin setelah diekstraksi, namun jika ekstrak harus disimpan, penyimpanan harus dilakukan dalam ruang gelap dan dingin. Setelah ekstraksi pigmen, klorofil dapat ditentukan dengan bermacam-macam metode berdasarkan metode berdasarkan spektrofotometri dan fluorometri, dengan atau tanpa pemisahan tiap-tiap pigmen.

Metode pengukuran pada sampel ekstrak kasar

Metode spektrofotometri absorpsi

Perhitungan simultan untuk mengestimasi konsentrasi klorofil dalam ekstrak kasar klorofil sebelumnya telah diberikan suatu petunjuk umum (French et al., 1972, Porra, 1991, Porra, 2002, Jeffrey and Welschmeyer, 1997). Metode tersebut pertama dipopulerkan oleh Arnon (1949) untuk menghitung komponen klorofil dalam daun. Dalam pengukuran spektrometrik klorofil adalah lazim untuk memastikan serapan pada panjang gelombang 750 nm bernilai nol dengan tujuan untuk mengoreksi turbiditas dan kontaminasi senyawa berwarna lain. Algoritma umum sederhana yang dapat digunakan untuk menjawab perhitungan dua komponen klorofil (klorofil 1 dan 2) dalam suatu campuran dapat diformulasikan sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Klorofil 1 } (\mu\text{g.mL}) &\approx E_{\lambda 1,1} A_{\lambda 1} + E_{\lambda 2,1} A_{\lambda 2} \\ \text{Klorofil 2 } (\mu\text{g.mL}) &\approx E_{\lambda 1,2} A_{\lambda 1} + E_{\lambda 2,2} A_{\lambda 2} \end{aligned}$$

Dimana $E_{\lambda 1,1}$ adalah koefisien serapan ($\text{mg.L}^{-1}.\text{cm.A}^{-1}$) untuk pita merah ($\lambda 1$) dari klorofil 1, $E_{\lambda 1,2}$ adalah koefisien serapan ($\text{mg.L}^{-1}.\text{cm.A}^{-1}$) untuk pita merah ($\lambda 1$) dari klorofil 2, dan $A_{\lambda 1}$ adalah absorbansi dari ekstrak pigmen pada panjang gelombang ($\lambda 1$) dalam nanometer.

Klorofil a dan b

Metode pengukuran spektrometri dari klorofil *a*, klorofil *b* dan total klorofil disempurnakan dari tahun ke tahun dengan memperhatikan ketelitian dan perkembangan teknologi alat ukur. Penentuan spektrofotometrik klorofil didasarkan pada hukum Beer-Lambert dan beragam persamaan yang telah diturunkan untuk penentuan konsentrasi total klorofil serta klorofil *a* dan klorofil *b* dalam campuran. Nilai absorbansi pada panjang gelombang dan ketebalan larutan yang telah ditentukan, diukur kemudian koefisien serapan spesifik dari pigmen murni pada panjang gelombang tersebut harus diketahui. Koefisien serapan spesifik α adalah $\frac{D}{dc}$ dimana D adalah nilai absorbansi, d adalah panjang lintas kuvet (pathlength) dalam satuan cm, sedangkan C adalah konsentrasi pigmen dalam satuan g.L^{-1} .

Arnon (1949) memformulasikan persamaan untuk ekstrak dalam pelarut aseton 80% dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 663 nm dan 645 nm dalam kuvet/sel 1 cm menggunakan data koefisien serapan spesifik yang diberikan oleh Mackinney (1941). Persamaan Arnon tersebut adalah (Arnon, 1949, Mackinney, 1941):

$$\begin{aligned} \text{Total klorofil } (\text{mg.L}^{-1}) &= 20,2D_{645} + 8,02D_{663} \\ \text{Klorofil } a \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 12,7D_{663} - 2,69D_{645} \\ \text{Klorofil } b \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 22,9D_{645} - 4,68D_{663} \end{aligned}$$

Nilai-nilai konstanta tersebut telah termodifikasi oleh beberapa peneliti lain, namun persamaan Arnon tersebut yang paling sering digunakan.

Terjadinya pergeseran pita pada panjang gelombang 663 nm menjadi agak lebih panjang, dapat mengidentifikasi adanya produk kerusakan klorofil. Absorbansi klorofil *b* maksimum terdapat pada bagian kurva yang curam. Hal ini biasanya baik untuk melakukan pembacaan pada panjang gelombang yang 18 nm lebih pendek daripada yang terekam pada klorofil *a*.

Serapan kuantitatif kurva klorofil *a* dan *b* dalam pelarut aseton 80% memotong pada 652 nm. Koefisien serapan spesifik pada titik tersebut didapatkan sebesar 36,0 (Bruuinsma, 1963). Total jumlah klorofil dapat ditentukan dengan mengukur absorbansi satuan mg.L^{-1} dari $1000D_{652}/36$, atau $27,8 D_{652}$. Pengukuran yang dilakukan pada 652 nm memberikan kontrol yang baik pada pita kurva klorofil dan memberikan informasi tentang adanya feofitin dan produk degradasi lainnya.

Dari koefisien serapan spesifik yang diberikan oleh (Mackinney, 1941) untuk klorofil *a* dan *b* dalam pelarut metanol, persamaannya mirip dengan yang digunakan dalam larutan aseton 80% yang telah diturunkan.

$$\begin{aligned} \text{Total klorofil (mg.L}^{-1}\text{)} &= 25,5D_{650} + 4,0D_{665} \\ \text{Klorofil } a \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 16,5D_{665} - 8,3D_{650} \\ \text{Klorofil } b \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 33,8D_{650} - 12,5D_{665} \end{aligned}$$

Kemudian Wintermans dan de Mots (1965) memberikan persamaan untuk menentukan klorofil dalam pelarut etanol 96%.

$$\begin{aligned} \text{Total klorofil (mg.L}^{-1}\text{)} &= 20,0D_{649} + 6,1D_{665} \\ \text{Klorofil } a \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 13,7D_{665} - 2,69D_{649} \\ \text{Klorofil } b \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 25,8D_{649} - 7,6D_{665} \end{aligned}$$

Wintermans dan de Mots (1965) membandingkan nilai yang diperoleh dengan metode spektrometri dalam bermacam-macam pelarut. Dia menemukan bahwa pita merah (Q_y) akan menjadi agak lambat ketika berada dalam pelarut aseton 80% dibandingkan dalam etanol 96%, dan hal ini tidak disebabkan oleh adanya pembentukan feofitin. Wintermans menganjurkan metode yang cepat untuk menghitung klorofil serta rasio klorofil *a* dan *b*. Selisih absorbansi pada pita klorofil *a* dan *b* dihitung kemudian nilai tersebut dikalikan dengan faktor-faktor yang relevan, dalam tabel yang diberikan untuk pigmen dalam pelarut etanol 96% dan dietil eter.

Arnon (1949) bukanlah yang pertama dalam mengembangkan perhitungan klorofil *a* dan *b* secara simultan. Sebelumnya Comar dan Zscheile (1942) telah melakukan pengukuran klorofil *a* dan *b* dalam dietil eter setelah sampel diekstrak dengan aseton. Ekstrak klorofil yang diekstrak dengan aseton tersebut dipartisi dengan dietil eter dan dicuci dengan penambahan air dan aseton. Lapisan eter dicuci dengan air secara hati-hati untuk menghilangkan aseton kemudian ditambah eter sampai volume tertentu. Selanjutnya larutan ini dikeringkan dengan Na_2SO_4 anhidrat kemudian diencerkan sampai menjadi larutan yang memiliki absorbansi antara 0,2 dan 0,8 pada 660 nm. Metode satu langkah yang dikembangkan oleh Arnon (1949) tersebut perlahan menggantikan metode Comar dan Zscheile (1942).

Berikut adalah persamaan yang diberikan oleh Comar dan Zscheile (Comar and Zscheile, 1942):

$$\begin{aligned} \text{Total klorofil (mg.L}^{-1}\text{)} &= 7,12D_{660} + 16,8D_{642.5} \\ \text{Klorofil } a \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 9,93D_{660} - 0,78D_{642.5} \\ \text{Klorofil } b \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 17,6D_{642.5} - 2,8D_{660} \end{aligned}$$

Smith dan Benitez (1955) memodifikasi persamaan tersebut berdasarkan panjang gelombang maksimum dan koefisien serapan spesifik yang dimilikinya.

$$\begin{aligned} \text{Klorofil } a \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 10,1D_{660} - 1,01D_{642.5} \\ \text{Klorofil } b \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 16,4D_{642.5} - 2,57D_{660} \end{aligned}$$

Pada panjang gelombang 600 nm, klorofil *a* dan klorofil *b* dalam pelarut dietil eter memiliki koefisien serapan 9,95. Pengukuran tunggal pada panjang gelombang tersebut akan memberikan kombinasi kandungan klorofil *a* dan *b* berdasarkan persamaan:

$$\text{Total klorofil (mg.L}^{-1}\text{)} = 1000/9,95D_{649} \text{ , yaitu } 100,5D_{660}$$

Kerugian persamaan ini adalah bahwa absorbansi klorofil *a* pada 600 nm hanya sekitar 10% dari absorbansi pada 662 nm.

Untuk menghindari keharusan melakukan perhitungan pada tiap-tiap penentuan, diperlukan dua panjang gelombang dalam pembacaan spektrofotometrik untuk mengukur jumlah klorofil *a* dan *b* (Šesták, 1966). Pada saat itu alat yang digunakan adalah nomogram. Nomogram diberikan pada makalah ini untuk klorofil dalam pelarut aseton 80% dan dietil eter. (Kirk, 1967) memberikan nomogram untuk penentuan klorofil dalam pelarut aseton 80%.

Penentuan spektrofotometrik klorofil *a* dan *b* dalam suatu campuran, mengasumsikan bahwa tak satupun pigmen mempengaruhi serapan spesifik lainnya. Van Norman (1957) memvariasi selisih klorofil *a* dan *b*, serta membandingkan nilai absorbansi yang diharapkan agar diturunkan dari spektra pigmen yang dimurnikan dan nilai kenyataan yang diperoleh. Dia menemukan bahwa ketika 2 pigmen terdapat pada bagian yang sama, misalnya dalam daun, ada persesuaian yang layak antara nilai yang diperkirakan dan nilai yang diukur, namun ketika satu pigmen kira-kira 5 kali sama pekatnya dengan yang lainnya, metode ini menjadi kurang dipercaya karena adanya pergeseran kecil pada panjang gelombang pita serapan. Hal ini baik untuk mengetahui bahwa nilai yang diperoleh untuk klorofil *b* cenderung tidak akurat dibandingkan nilai klorofil *a*. Kenyataan ini terjadi karena absorbansi yang dibaca klorofil *b* maksimum diambil pada bagian yang curam dari kombinasi kurva klorofil *a* + klorofil *b*, adanya pergeseran panjang gelombang kecil dapat menyebabkan kesalahan besar dalam pengukuran absorbansi.

mengembangkan suatu metode untuk penentuan klorofil dalam metanol yang dapat membantu dalam membuat perkiraan klorofil *b* yang lebih realistis. Ini didasarkan pada reaksi gugus aldehyd pada klorofil *b* dengan hidroksilamin pada pH 5,8 untuk memberikan suatu turunan yang memiliki pita di daerah merah pada posisi yang mirip dengan klorofil *a*. karena absorbansi klorofil *a* tidak berpengaruh, pembacaan dilakukan pada 666 nm dengan atau tanpa adanya hidroksilamin.

Tabel 5. Kesalahan dalam koefisien serapan spesifik pada Mackinney (1941). Koefisien serapan spesifik dari klorofil *a* dan *b* dalam aseton 80% yang didapat dari Mackinney (1941) dan Porra et al. (1989) dibandingkan. Prosentase nilai kesalahan dihitung dengan mengasumsikan bahwa koefisien pada Porra et al. (1989) akurat.

Publikasi	Panjang Gelombang (nm)	Klorofil <i>a</i>		Klorofil <i>b</i>	
		Koefisien serapan spesifik (α)	Nilai Kesalahan	Koefisien serapan spesifik (α)	Nilai Kesalahan
Porra et al. (1989)	663.6	85.95	0	10.78	0
	646.6	20.79	0	51.84	0
Mackinney (1941)	663	82.04	-4.55%	9.27	-14.01%
	645	16.75	-19.43%	45.60	-12.03%

Dengan berkembangnya akurasi dan sensitifitas spektrofotometer kerusakan pada klorofil dapat dideteksi sedini mungkin. Kemudian digunakan pelarut aseton dalam larutan bufer pada pH 7.8 untuk menekan terbentuknya feofitin yaitu lepasnya atom magnesium dengan adanya metabolit lain yang bersifat asam yang ikut terekstrak. Pada Tabel 1 kita dapat melihat metode Mackinney (1941) yang memiliki nilai kesalahan yang tinggi disebabkan oleh penggunaan 80% aseton dalam air, sedangkan metode Porra et al. (1989) menggunakan 80% acetone dalam larutan bufer pH7.8.

Pelarut aseton 80% sebagai pengeksrak klorofil dapat digantikan dengan DMF (N,N'-dimetil formamida), DMSO (dimetil sulfosida) dan metanol. Dalam pelarut DMF dan DMSO, seperti pada acetone 80%, klorofil *a* dan *b* memiliki pita-pita Q_y yang tajam. Namun perlu diperhatikan bahwa DMF dan DMSO lebih toksik dibandingkan aseton 80%. Sedangkan pita-pita absorpsi Q_y dari klorofil dalam metanol lebar dan tidak tajam apabila dibandingkan dengan aseton 80%, walau dapat mengekstrak klorofil dengan efisien. Metanol dapat meningkatkan degradasi klorofil dengan membuka cincin isosiklik, khususnya dalam keadaan basa (Porra, 1990a, Porra, 1990b, Porra, 1991). Oleh sebab determinasi klorofil dalam DMF, metanol dan aseton 80% tidak memungkinkan, maka Porra et al. (1989) berhasil mendapatkan koefisien serapan molar (ϵ) dan spesifik (α) klorofil *a* dan *b* murni dalam ketiga pelarut tersebut (Porra et al., 1989). Koefisien tersebut dapat dilihat pada Tabel 2. Dengan menggunakan persamaan pada Tabel 3, maka konsentrasi klorofil *a* dan *b* serta rasio klorofil *a/b* kini dapat dihitung dengan tepat dalam ketiga pelarut tersebut (Porra et al., 1989). Beberapa penggunaan pelarut baru, selain dari ketiga pelarut diatas, juga telah dicoba untuk mengekstrak klorofil dari jaringan yang sulit seperti pada daun yang kasar, dengan cara merendam sampel dalam waktu yang lama serta memotong daun kecil-kecil dan dilanjutkan dengan penghancuran daun dengan mortar. Namun demikian metode ini menghasilkan efek dimana sampel teroksidasi dan klorofil menjadi terdegradasi (Porra et al., 1989). Ketiga larutan pengeksrak berikut ini dikembangkan untuk mengisolasi klorofil *a* dan *b* dari alga hijau dan mikroalga laut yang sulit untuk diekstrak:

- 1) Larutan pirinin 2.1 M yang mengandung 0.35 M NaOH digunakan untuk mengekstrak klorofil *a* dan *b* dari sel *Chlorella fusca* (Porra, 1991).
- 2) Larutan metanol 85% yang mengandung 2% KOH dan 1.5 mM sodium dithionite untuk mengekstrak klorofil *a* dan *b* dari sel *Nannochloris atomus* (Porra, 1990b).
- 3) Larutan metanol 85% yang mengandung 1.5 mM sodium dithionit untuk mengekstrak klorofil *a* dan *b* dari sel *Nannochlorois atomus* (Porra, 1990a).

Tabel 6. Koefisien serapan molar (ϵ) dan spesifik (α) dari klorofil *a* dan *b* yang telah dikoreksi dalam pelarut aseton 80% berbufer pH 7.8, DMF dan metanol. Dalam pengukuran spektrometer, pada panjang gelombang 750 nm dibuat nol, sehingga koefisien yang dicatat merupakan perbedaan antara koefisien pada panjang gelombang di puncak pita Q_y dan 750 nm. Setiap koefisien yang dicatat adalah rata-rata dari pengukuran tripliket, dimana deviasi standar dilaporkan sebelumnya (Porra et al., 1989).

Pelarut	Panjang Gelombang (nm)	Perbedaan koefisien ekstinsi			
		Klorofil <i>a</i>		Klorofil <i>b</i>	
		Milimolar (ϵ_{mM})	Spesifik (α)	Milimolar (ϵ_{mM})	Spesifik (α)
Larutan aseton 80% dengan bufer pH 7.8	663.6 dikurangi 750	76,79	85,95	9,79	10,78
	646.6 dikurangi 750	18,58	20,79	47,04	51,84
DMF	663.8 dikurangi 750	79,29	88,74	12,03	13,26
	646.8 dikurangi 750	18,62	20,84	46,49	51,23
Metanol	665.2 dikurangi 750	71,43	79,95	20,20	22,26
	652.0 dikurangi 750	31,65	35,42	38,55	42,48

Tabel 7. Persamaan untuk perhitungan secara simultan konsentrasi klorofil *a* dan *b* dalam pelarut aseton 80% berbufer, DMF dan metanol dengan menggunakan koefisien serapan pada Tabel 2.

Pelarut	Persamaan perhitungan konsentrasi klorofil (nmol/mL)	Persamaan perhitungan konsentrasi klorofil (μ mol/mL)
Larutan aseton 80% dengan bufer pH 7.8	[klorofil <i>a</i>] = $13,71E^{663,6} - 2,85E^{646,6}$	[klorofil <i>a</i>] = $12,25E^{663,6} - 2,55E^{646,6}$
	[klorofil <i>b</i>] = $22,39E^{646,6} - 5,42E^{663,6}$	[klorofil <i>b</i>] = $20,31E^{646,6} - 4,91E^{663,6}$
	[klorofil <i>a+b</i>] = $19,54E^{646,6} - 8,29E^{663,6}$	[klorofil <i>a+b</i>] = $17,76E^{646,6} - 7,34E^{663,6}$
DMF	[klorofil <i>a</i>] = $13,43E^{663,8} - 3,47E^{646,8}$	[klorofil <i>a</i>] = $12,00E^{663,8} - 3,11E^{646,8}$
	[klorofil <i>b</i>] = $22,90E^{646,8} - 5,38E^{663,8}$	[klorofil <i>b</i>] = $20,78E^{646,8} - 4,88E^{663,8}$

Metanol	$[\text{klorofil } a+b] = 19,43E^{646,8} - 8,05E^{663,8}$	$[\text{klorofil } a+b] = 17,67E^{646,8} - 7,12E^{663,8}$
	$[\text{klorofil } a] = 18,22E^{665,2} - 9,55E^{652,0}$	$[\text{klorofil } a] = 16,29E^{665,2} - 8,54E^{652,0}$
	$[\text{klorofil } b] = 33,78E^{652,0} - 14,96E^{665,2}$	$[\text{klorofil } b] = 30,66E^{652,0} - 13,58E^{665,2}$
	$[\text{klorofil } a+b] = 24,23E^{652,0} - 3,26E^{665,2}$	$[\text{klorofil } a+b] = 22,12E^{652,0} - 2,71E^{665,2}$

Klorofil dan protoklorofil (id)

Pengukuran ini sama sekali tidak jelas karena ada kemungkinan terdapat pigmen yang mengandung fitil maupun yang tidak mengandung fitil, yang memiliki persamaan spektra serapan namun berada dalam berat molekul. Koefisien serapan spesifik untuk protoklorofilid (id) yang diisolasi dari semaian gandum terisolasi dan persamaan untuk penentuan klorofil dan protoklorofilid (id) dalam pelarut dietil eter pada semaian hijau terisolasi dalam cahaya telah ditentukan (Koski, 1950, Koski and Smith, 1948). Untuk mencegah transfer pigmen dari satu pelarut ke pelarut lainnya, Anderson dan Boardman (1964) memberikan persamaan untuk memperkirakan pigmen dalam aseton 80% pada pembacaan absorbansi pada 663 nm, 645 nm dan 626 nm (Anderson and Boardman, 1964).

$$\begin{aligned} \text{Klorofil a (mg.L}^{-1}\text{)} &= 12,67D_{663} - 2,65D_{645} - 0,29D_{626} \\ \text{Klorofil b (mg.L}^{-1}\text{)} &= 23,60D_{645} - 4,23D_{663} - 0,33D_{626} \\ \text{Ptoroklorofil (id) (mg.L}^{-1}\text{)} &= 29,60D_{626} - 3,99D_{663} - 6,76D_{645} \end{aligned}$$

Persamaan tersebut telah digunakan oleh beberapa peneliti termasuk yang telah meneliti adanya kumpulan klorofil melalui perkembangan kloroplas secara *in vitro* (Rebeiz et al., 1973).

Klein dan Scjiff (1972) juga memberikan persamaan untuk menentukan klorofil(id) a dan protoklorofil(id) dalam larutan aseton (Klein and Schiff, 1972).

$$\begin{aligned} \text{Klorofil (mg.L}^{-1}\text{)} &= 12,2013D_{663} - 0,0699D_{626} \\ \text{Ptoroklorofil (id) (mg.L}^{-1}\text{)} &= 28,681D_{626} - 5,2091D_{663} \end{aligned}$$

Klorofil c dan klorofil d

Klorofil *c* ditemukan bersama dengan klorofil *a* di banyak jenis alga laut. Klorofil *c* yang banyak ditemukan adalah c_1 dan c_2 dimana keduanya memiliki spektrum absorpsi yang sangat identik satu dengan yang lain (Jeffrey, 1969). Ada dan tidaknya klorofil c_1 , c_2 , c_3 , dan d dalam organisme oksigenik laut biasanya penting digunakan sebagai sidik jari taksonomi. Pita serapan klorofil akan terlihat tajam dalam pelarut aseton, oleh sebab itu aseton digunakan sebagai pelarut dalam perhitungan klorofil (Jeffrey, 1972). Namun demikian aseton kurang baik digunakan untuk mengekstrak klorofil dari jaringan tumbuhan dan beberapa alga, khususnya alga hijau. Ekstraksi yang menyeluruh dari semua jenis klorofil adalah langkah utama dalam mendeterminasi konsentrasi klorofil dalam bahan alam, misalnya sampel planton, alga, terumbu karang, rumput laut, dan sebagainya, secara khusus apabila dibutuhkan perhitungan terkait rasio konsentrasi klorofil sebagai parameter sidik jari dari jenis kelas alga yang ada (Zapata et al., 2004). Metanol dan etanol digunakan lebih sering sebagai pengekstraksi yang efektif (Ritchie, 2006).

Selama beberapa tahun, klorofil *a*, *b* dan *c* dalam organisme plankton ditentukan dengan metode “trikromatik” Richards dan Thomson (1952). Metode tersebut saat ini sudah ketinggalan jaman, namun metode lainnya yang terdiri dari pembacaan spektrofotometrik pada 3 panjang gelombang adalah metode yang digunakan. Saat ini, klorofil *c* tersebut ditemukan merupakan suatu campuran dari kompleks yang terdiri dari 2 komponen. Namun hal ini tidak seserius yang mereka kira karena dalam dinoflagelata dan cryptomonad, hanya klorofil c_2 yang terdapat dalam jumlah yang sama. Dalam praktiknya, c_1 tidak harus diperlakukan seperti senyawa yang dipisahkan.

S.W. Jeffrey dan G.F. Humphrey telah menurunkan persamaan baru untuk pigmen alga dalam ekstrak aseton berdasarkan koefisien serapan penentuan klorofil *a* dan *b* yang telah ditinjau ulang oleh Jeffrey, serta nilai klorofil c_1 dan c_2 yang sama dalam aseton 80% (Jeffrey and Humphrey, 1975), persamaan yang digunakan adalah:

$$\begin{aligned} \text{Klorofil } a &= 11,85D_{664} - 1,54D_{647} - 0,08D_{630} \\ \text{Klorofil } b &= -5,43,60D_{644} + 21,03D_{647} - 0,33D_{630} \\ \text{Klorofil } c_1 + c_2 &= -1,67D_{664} - 7,60D_{647} + 24,52D_{630} \end{aligned}$$

Untuk diatom dan chrysomonad, persamaan dalam pelarut aseton 90% adalah:

$$\begin{aligned} \text{Klorofil } a &= 11,47D_{664} - 0,40D_{630} \\ \text{Klorofil } c_1 + c_2 &= 24,36D_{636} - 3,73D_{664} \end{aligned}$$

Sedangkan untuk dinoflagelata dan chrysomonad, persamaan dalam pelarut aseton 100% adalah:

$$\begin{aligned} \text{Klorofil } a &= 11,43D_{663} - 0,64D_{630} \\ \text{Klorofil } c_2 &= 27,09D_{630} - 3,63D_{663} \end{aligned}$$

Bakterioklorofil

Bakterioklorofil sering ditentukan dengan metode van Niel dan Arnold (1938). Karena kestabilan klorofil dalam pelarut organik terhadap cahaya, klorofil diubah menjadi feofitin. Pada metode awal, absorbansi pada 667,5 nm diukur, namun Lascelles (1956) memodifikasinya dan melakukan pembacaan pada 650 nm di mana terjadi serapan maksimum (Lascelles, 1956). Cohen-Bazire dkk (1957) menentukan bakterioklorofil tanpa mengubahnya menjadi feofitin. Absorbansi ekstrak metanolik mutan biru-hijau *Rhodobacter spheroides* diukur pada 775 nm dan sejumlah klorofil diekspresikan dalam mg/100mL larutan biakan, yang dihitung dari $D_{775} \times 2,58$ ketika menggunakan 5 mL sampel (Cohen-Bazire et al., 1957). Untuk ekstrak aseton-aseton dari *R. rubrum* dan tipe *R. spheroides* liar, faktor 2,19 digunakan sebagai pengganti 2,58. Metode penentuan konsentrasi bakterioklorofil *a* kemudian disempurnakan lebih lanjut untuk menghitung rasio bakterioklorofil dan karotenoid dalam kompleks antena penangkap cahaya B890 pada bakteri fotosintesis *Rhodospirillum rubrum* dan kompleks B800-850 pada *Rhodobacter sphaeroides*. Metode tersebut terlebih dahulu menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) untuk memisahkan bakterioklorofil dan kemudian melarutkannya dalam aseton:metanol (7:2, v/v) serta mengukur puncak serapan pada pita serapan Q_y . Konsentrasi bakterioklorofil dihitung dengan persamaan Beer-Lambert dengan ekstinsi serapan milimolar pada pita Q_y dengan panjang gelombang 772 nm sebesar $76 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Evans et al., 1988).

Metode penentuan klorofil sebagai feofitin dan pengukuran jumlah klorofil relatif serta produk kerusakannya dalam campuran

Karena sifat klorofil yang tidak stabil terhadap cahaya, maka klorofil mudah diubah menjadi feofitin yang lebih stabil sebelum melakukan pengukuran kuantitatif. Telah dikembangkan metode yang dapat digunakan untuk mengerjakan pekerjaan ini. Namun, bermacam-macam masalah tetap muncul yang dapat menyulitkan penentuan, hingga tampak kecil keuntungannya.

Wickliff dan Aronoff (1962) menentukan klorofil secara kolorimetri dan spektrofotometri pada ekstrak jaringan tanaman dalam metanol dengan mengubah klorofil menjadi feofitin melalui penambahan HCl. Koefisien ekstinsi spesifik feofitin ditentukan dalam etanol 80%. Ketika prosedur ini diterapkan pada ekstrak tanaman abnormal, walaupun sebenarnya salah, selisih klorofil *a* dan *b* dapat diperoleh. Koefisien serapan "operasional" selanjutnya dihitung dengan mentransfer pigmen dari ekstrak ke dalam dietil eter dan spektrofotometri dilakukan dalam pelarut tersebut. Wickliff dan Aronoff juga menganjurkan bahwa semua koefisien operasional ini seharusnya ditentukan pada tiap perbedaan sistem yang digunakan. Perbedaan spektra feofitin *a* dan *b* antara yang diamati dan yang diperhitungkan tampaknya disebabkan oleh ko-pigmentasi feofitin *a* dengan bahan lain dan selanjutnya dapat disebabkan oleh proses polimerisasi.

Wilson dan Nutting (1963) menggunakan metode kolom resin penukar ion Dower 50W-X4 dalam bentuk kation, untuk menghilangkan magnesium dari klorofil dan mengubahnya menjadi feofitin, yang dapat menyebabkan kerusakan feofitin juga dihilangkan, dan feofitin yang diperoleh bersifat lebih stabil daripada yang dibentuk dengan perubahan penggunaan asam. Teknik ini menjadi dasar metode untuk penentuan klorofil secara kuantitatif. Feofitin dielusi secara terpisah dari kolom, dan absorbansi diukur

pada 667 dan 409 nm untuk feofitin *a* dalam aseton 85%, serta 654 dan 436 nm untuk feofitin *b* dalam aseton 100%. Tetrasioetilen ditambahkan untuk menghilangkan serapan karotenoid yang akan mengganggu pengukuran pada panjang gelombang maksimum yang lebih pendek.

Wintermans (1969), yang menggunakan metode koefisien serapan spesifik feofitin dalam etanol yang ditentukan oleh Wintermans dan de Mots (1965), menegaskan bahwa selisih klorofil *a* dan *b* salah apabila diperhitungkan dari penentuan feofitin pada ekstrak daun yang diasamkan. Dia menganggap bahwa koefisien serapan feofitin *a* pada 655 nm secara kritis penting, namun masih agak bervariasi untuk sebab yang tak diketahui.

Para ahli teknologi pangan tertarik untuk menentukan jumlah klorofil dan feofitin secara relatif dan mutlak pada sayuran hijau yang mengalami perlakuan atau yang diinginkan. Mackinney dan Weast (1940) merencanakan suatu metode untuk melakukan dasar penelitian ini dengan mengubah klorofil menjadi feofitin secara kuantitatif menggunakan asam oksalat. Absorbansi ekstrak larutan aseton diukur baik sebelum maupun sesudah perubahan, pada panjang gelombang dimana terjadi peningkatan absorbansi maksimum (535 nm) dan pada suatu titik perpotongan kurva feofitin dan klorofil (560 nm) dimana tidak terdapat perubahan. Beberapa makalah sebelumnya telah mengembangkan modifikasi ini (Sweeney and Martin, 1958).

Sweeney dan Martin (1958) menghitung persentase penyimpanan klorofil dengan cara sebagai berikut. Total klorofil dan feofitin diperoleh dengan membagi absorbansi pada 558 nm dengan serapan spesifik konstan pada panjang gelombang tersebut. Konsentrasi klorofil yang tertahan, dihitung dari nilai rata-rata yang diperoleh, dengan membagi perubahan absorbansi pada 535, 642,5 dan 660 nm dengan serapan spesifik konstan yang sama selama perubahan absorbansi pada panjang gelombang ini. Selanjutnya memisahkan klorofil pada ekstrak sayuran yang dimasak dan sayuran beku mentah menggunakan kolom serbuk gula, lalu mengubah pigmen yang terelusi menjadi feofitin selaman pengukuran spektrofotometrik.

Vernon (1960) mengembangkan metode Sweeney dan Martin (1958) agar total klorofil, total feofitin, klorofil *a* dan *b*, feofitin *a* dan *b* serta persentase penyimpanan klorofil, semuanya dapat ditentukan pada ekstrak sayuran hijau dalam aseton 80% (Vernon, 1960). Sejumlah persamaan diturunkan, untuk mengerjakan penelitian ini berdasarkan penentuan koefisien serapan spesifiknya dan mengubah nilainya pada beberapa panjang gelombang. Ekstrak jaringan tanaman dalam aseton disiapkan, dan 2 sampel diambil salah satu sebagai kontrol dan sisanya untuk perubahan feofitin. Asam oksalat jenuh dalam aseton 80% ditambahkan pada perubahan sampel, dan aseton 80% dengan volume sama juga ditambahkan pada kontrol. Kedua sampel tersebut disimpan dalam gelap pada suhu ruang selama 3 jam, dan absorbansinya dibaca pada 536, 558, 645, 649, 655, 662, 665, 667 dan 700 nm. Pembacaan pada 700 nm menjadi pedoman kemurnian optik larutan tersebut. Nilai pada 649 dan 665 nm dipergunakan apabila konsentrasi klorofil dapat dihitung secara langsung, yang mengasumsikan tidak adanya perubahan klorofil menjadi feofitin. Konsentrasi feofitin setelah perubahan dengan asam oksalat diberikan dengan persamaan berikut ini, dengan pembacaan absorbansi pada 666 dan 655 nm.

$$\begin{aligned} \text{Total feofitin (mg.L}^{-1}\text{)} &= 6,75D_{666} + 26,03D_{655} \\ \text{Feofitin } a \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 20,15D_{666} - 5,87D_{655} \\ \text{Feofitin } b \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} &= 31,90D_{655} - 13,40D_{666} \end{aligned}$$

Persamaan lainnya diberikan dengan pembacaan absorbansi pada 666 dan 536 nm.

Tan dan Francis (1962) melakukan kromatografi ekstrak bayam yang telah diproses dan feofitin *a* dan *b* yang diperoleh dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan serta fraksi lainnya yang mengandung klorofil *a* dan *b* (Tan and Francis, 1962). Konsentrasi klorofil dihitung dari persamaan Comar dan Zscheile (1942) yang dimodifikasi pada ekstrak asetonnya. Konsentrasi feofitin *a* dalam satuan mg.L⁻¹ diberikan dengan 17,6667,5, dan feofitin *b* dengan 31,4D₆₅₅ (Comar and Zscheile, 1942). White dkk (1963) mengembangkan metode penguraian yang agak terperinci berdasarkan partisi antar pelarut dan proses pengasaman selama penentuan klorofil, klorofilid, feofitin dan feoforbid pada bahan tanaman yang telah mengalami pemrosesan, dan menurunkan satu set 16 persamaan untuk menghitung konsentrasi bermacam-macam pigmen dalam dietil eter (White et al., 1963).

Penentuan klorofil sering digunakan sebagai suatu ukuran adanya fitoplankton, namun adanya produk degradasi klorofil dapat memperlihatkan kesalahan. Para ahli kelautan dan biologi air, selanjutnya tertarik untuk menentukan jumlah produk degradasi tersebut menggunakan koefisien serapan spesifik yang lebih kecil daripada yang terdapat dalam ekstrak alga. Teknik kromatografi tampaknya akan menjadi metode pilihan untuk masalah ini, namun metode spektrofotometrik untuk laga telah disusun dimana metode tersebut mirip dengan metode spektrofotometrik untuk sayuran hijau (Moss, 1967b, Moss, 1967a, Lorenzen, 1966).

Metode Fluorimetrik

Goodwin (1947) mengembangkan suatu metode fluorimetrik untuk penentuan konsentrasi klorofil, namun secara umum metode fluorometri belum sering digunakan seperti layaknya metode spektrometri, walaupun metode tersebut lebih peka, Karena hanya membutuhkan sekitar 1% pigmen. Bagaimanapun juga, beberapa peneliti khususnya Virgin, telah menggunakan pengukuran fluoresensi secara ekstensif selama bertahun-tahun. Dia menggunakan fluorimetry untuk menentukan konsentrasi klorofil pada ekstrak daun dan dalam elusi kromatografi kertas (Virgin, 1960, Virgin, 1961). Metode fluoresensi lama dikembangkan untuk menentukan selisih klorofil *a* dan *b* saat jumlah klorofil *b* lebih sedikit daripada klorofil *a* (Boardman and Thorne, 1971). metode ini didasarkan pada eksitasi klorofil *a* yang lemah pada panjang gelombang di mana eksitasi klorofil *b* maksimal. Pengukuran dilakukan pada 2 kondisi untuk rasio klorofil *a* terhadap *b* antara 6-60, fluoresensi larutan pigmen dalam dietil eter tereksitasi pada 453 nm pada suhu ruang, dan fluoresensi emisi diukur pada 646 dan 666 nm. Sedangkan untuk rasio klorofil *a* terhadap *b* antara 6-100 (bahkan sampai 1000), dengan pelarut etanol akan tereksitasi pada panjang gelombang 478 nm dan suhu 77K; fluoresensi direkam pada 658 dan 678 nm.

White dkk (1972) memberikan penentuan fluorimetrik secara mendetail dalam dietil eter atau aseton 80% untuk satu atau lebih dari ke-8 pigmen klorofil *a* dan *b*, klorofilid *a* dan *b*, feofitin *a* dan *b*, feoforbid *a* dan *b*, ketika semua pigmen tersebut terdapat sebagai campuran (White et al., 1972). Perkiraan yang meliputi partisi antar pelarut kemudian berdasarkan perhitungan yang diturunkan dari pembacaan menggunakan 3 filter utama dan 1 tau 2 filter kedua.

Para pakar biologi kelautan dan akuatik telah menggunakan metode fluorimetrik, Karena mereka sering memiliki jumlah pigmen yang sangat sedikit untuk diukur. Yentsch dan Manzel (1963) mengembangkan penentuan klorofil dan feofitin dalam plankton dengan mengukur fluoresensi ekstrak aseton, hal ini merupakan dasar pengembangan metode selanjutnya. Mereka menemukan bahwa baik konsentrasi klorofil *a* dan atau jumlah klorofil *a* dan *c* dapat diukur dengan penyaring yang cocok (Holm-Hansen et al., 1965). Dengan melakukan pengukuran fluoresensi sebelum dan sesudah penambahan asam, jumlah klorofil dan feofitin relatif dapat diperkirakan. Loftus dan Carpenter (1971) selanjutnya mengembangkan penentuan fluorimetrik pigmen-pigmen alga. Mereka memberikan deskripsi lengkap tentang metode mereka untuk menentukan klorofil *a*, *b*, dan *c* menggunakan bermacam-macam kombinasi penyaring untuk mengamati fluoresensi . Mereka juga memberikan metode perkiraan untuk feofitin *a*.

Metode non-destruktif

Kadang-kadang perlu untuk menentukan kandungan klorofil dari suatu sampel tertentu tanpa harus merusaknya. Selanjutnya determinasi dapat dilakukan dan kesalahan dalam pengambilan sampel dapat dibatasi. Berbagai-bagai metode non-destruktif telah banyak dikembangkan, dari pengukuran total kandungan klorofil semi kuantitatif untuk mengetahui perubahan spektra serapan atau emisi dari jaringan dengan berbagai perlakuan. Peralatan yang dipergunakan dapat terdiri dari peralatan murah dan sederhana ataupun kompleks. Dalam satu dekade terakhir ini, metode non-destruktif menjadi trending dalam perkembangan teknologi karena dengannya data-data fenotipe dan fisiologis secara *in situ* dari sampel dapat diperoleh.

Soil Plant Analysis Development (SPAD) meter merupakan contoh dari alat ukur dalam metode non-destruktif untuk klorofil daun (lihat tautan berikut untuk melihat contoh alat SPAD meter:

<https://www.konicaminolta.eu/en/measuring-instruments/products/colour-measurement/chlorophyll-meter/spad-502plus/introduction.html>). SPAD meter sebenarnya digunakan untuk mengestimasi kandungan total klorofil pada daun tumbuhan tingkat tinggi, misalnya padi (Turner and Jund, 1991), gandum (Reeves et al., 1993), jagung (Waskom et al., 2008), jelai (Pagola et al., 2009), dan digunakan dalam memonitor kandungan nitrogen dalam daun sebagai sistem manajemen pertanian (Xiong et al., 2015). Keuntungan utama penggunaan SPAD adalah dapat memberikan estimasi yang cepat dengan akurasi yang tinggi. Secara umum cara kerja SPAD adalah mengukur absorbansi daun pada panjang gelombang 650 dan 940 nm dengan LED diode sebagai sumber cahayanya. Berdasarkan pengukuran absorbansi tersebut nilai SPAD dikorelasikan dengan kandungan klorofil total daun dengan menggunakan persamaan linear. Agar pengukuran dapat akurat maka biasanya dilakukan pengulangan hingga tiga kali dan nilai rata-rata yang didapatkanlah yang dicatat.

Contoh kedua dari metode non-destruktif untuk mengestimasi kandungan klorofil pada daun dan mengaitkannya dengan perubahan fenotipe tanaman adalah dengan metode citra digital multispektral dan hiper-spektral (Li et al., 2014, Perez-Patricio et al., 2018). Citra digital multispektral adalah citra digital yang ditangkap oleh kamera yang telah melalui filter dengan rentang panjang gelombang tertentu, biasanya mengombinasikan pada rentang cahaya tampak (400 s.d. 700 nm), inframerah dekat (700 s.d. 1000 nm), inframerah gelombang pendek (*short-wave infrared*, 1 s.d. 1,7 μm), inframerah gelombang menengah (*mid-wave infrared*, 3,5 s.d. 5 μm), atau inframerah gelombang panjang (*long-wave infrared*, 8 s.d. 10 μm). Sedangkan citra digital hiper-spektral biasanya memiliki rentang pengukuran panjang gelombang yang lebih detil dibandingkan multispektral, misalnya mengukur citra digital pada setiap 100 nm. Beberapa satelit, seperti Landsat 8 OLI dan RapidEye, juga dilengkapi citra digital multispektral dengan 5 hingga 9 pita untuk mengakuisisi data guna mendapatkan informasi terkait kandungan klorofil pada tanaman terestrial atau plancton dan alga di permukaan air laut. Namun demikian resolusi dari satelit bervariasi dan biasanya maximum hanya 5 meter (misalnya satelit RapidEye), sehingga saat ini telah ada kamera-kamera multispektral atau hiper-spektral yang dapat ditempatkan pada pesawat tak berawak (*unmanned aerial vehicle*). Contoh dari multispektral dan hiper-spektral kamera komersial dapat dilihat pada tautan berikut <http://www.tetracam.com>; <https://www.micasense.com>; <https://www.spectraldevices.com>. Aplikasi metode multispektral tersebut telah dikembangkan maju dan digunakan untuk mengamati perubahan fenotipe dari tumbuhan jagung di perkebunan terhadap tekanan biotik dan abiotik (Zaman-Allah et al., 2015), aplikasi dalam pertanian presisi sehingga dengan klorofil sebagai parameter kondisi tanaman dan produktivitasnya dapat dipantau (Svensgaard et al., 2014), dan bahkan digunakan untuk mengamati siklus ritme sirkadian klorofil pada tanaman kedelai (Pan et al., 2015).

Sedangkan untuk sampel mikroskopis seperti kloroplas pada daun, mikroalga, sianobakteria, dan fitoplanton determinasi klorofil dengan metode non-distruktif dapat menggunakan mikroskop fluoresensi atau mikroskop vibrasi raman. Dengan mikroskop fluoresensi konfokal misalnya dapat mendeterminasi lokalisasi dan distribusi klorofil secara *in vivo* dalam sel sianobakteria (Vermaas et al., 2008).

Metode pemisahan

Pemisahan dengan Partisi Menggunakan Beberapa Pelarut

Metode pemisahan pigmen tanaman yang didasarkan pada perbedaan kelarutan dalam bermacam-macam pelarut merupakan metode yang paling lama, namun saat ini metode tersebut dihindari karena lamanya waktu partisi malah mengakibatkan kemungkinan besar terdegradasinya klorofil sebagaimana yang telah kita bahas di sub-bab di atas. Secara umum klorofil dapat dipisahkan dari pigmen-pigmen lain dan karotenoid dengan metode partisi antara pelarut polar dengan non-polar dan antara dietil eter dengan larutan HCl dalam labu pemisah. Pemisahan pigmen yang mengandung fitil maupun yang tidak mengandung fitil dapat diperoleh dengan mengocok larutan aseton dengan hidrokarbon rantai pendek; pigmen berfitil masuk ke dalam lapisan petroleum sementara pigmen tak berfitil tersisa dalam pelarut aseton. Wun (1980) mencoba mengembangkan prosedur partisi dengan menggunakan asetonitril dan heksan untuk memisahkan klorofil dan feofitin (Wun et al., 1980). Setelah menguji efisiensi separasi pigmen tersebut dengan pigmen standar, maka didapatkan perolehan kembali (*recovery*) dari klorofil a

dan feofitin *a* memiliki efisiensi sebesar 95-98% dan 93-96%. Sebelumnya pemisahan arus yang berlawanan merupakan suatu pengembangan partisi yang canggih antar pelarut. Teknik ini digunakan untuk memastikan klorofil *a* dan *b* dari pigmen-pigmen lainnya dan dari karotenoid menggunakan larutan metanol dan petroleum eter. Hynninen dan Ellfolk (1973a) memisahkan klorofil *a* dan *b* dengan partisi cair-cair dengan sistem pelarut lebih kompleks yang terdiri dari petroleum eter-bensen-netanol-formamida (Hynninen and Ellfolk, 1973). Pada saat ini separasi dengan metode partisi pelarut dihindari dengan alasan ekonomis, menghindari pelarut berbahaya untuk kesehatan, dan menghindari terdegradasinya klorofil selama proses partisi.

Kromatografi kolom

Kromatografi kolom juga merupakan metode separasi klorofil yang konvensional. Saat ini metode kromatografi kolom biasanya digunakan untuk separasi tahap awal dalam jumlah yang besar dengan tujuan untuk memperoleh sampel klorofil kasar yang telah terpisahkan dari komponen karotenoid sehingga siap untuk masuk dalam proses separasi berikutnya untuk memisahkan setiap komponen klorofil. Berbagai macam resin penjerap telah digunakan untuk separasi klorofil dan turunannya. Penjerap tersebut meliputi senyawa-senyawa seperti alumina dan magnesia, serbuk polietilen, sukrosa dan polisakarida yang diserbukan seperti inulin, ragi dan selulosa, atau sefaros. Penjerap inorganik yang cocok untuk pemisahan pigmen-pigmen lain, biasanya tidak dianjurkan untuk klorofil karena penjerap tersebut sering menyebabkan dekomposisi.

Sukrosa. Sukrosa yang diserbukan mungkin merupakan penjerap yang paling sering digunakan untuk pemisahan klorofil dari produk-produk degradasinya. Gula halus yang mengandung 3% zat tepung, sudah dirasa memuaskan oleh beberapa peneliti, dan lapisan gula yang mengandung sekitar 1-5% kalsium fosfat juga dapat digunakan. Strain (1958) memberikan pedoman lengkap dalam penyiapan kolom. Dia menemukan bahwa gula tidak perlu dikeringkan atau diayak sebelum menggunakannya, namun untuk penjerap lainnya diperlukan adanya proses pengeringan dan mengayak. 50 Gram gula dalam pipa berdiameter 2,5 cm, menghasilkan kolom dengan tinggi sekitar 15 cm dan kolom ini mampu memisahkan sekitar 5 mg klorofil *a* dan *b*. Selanjutnya, pipa diikat pada labu pengisap, dan puncak penjerap kering. Kromatogram biasanya dikembangkan dengan 0,5% *n*-propanol dalam petroleum eter, namun Smith dan Benitez (1955) hanya menggunakan hidrokarbon rantai pendek saja. Sebagai alternatif, kolom dapat dikembangkan dan dielusi dengan larutan aseton dalam hidrokarbon rantai pendek, diawali dengan aseton 5% dan diakhiri dengan 25%. Campuran bensin-hidrokarbon rantai pendek juga dapat digunakan, namun karena risiko kesehatan, campuran yang mengandung bensin tersebut harus dielusi. Klorofil *a* bergerak mendahului lutein dan zeaxantin yang diikuti oleh klorofil *b* dan 2 pigmen ksantofil lainnya. Feofitin *a*, jika ada, bergerak mendahului klorofil *a* dan feofitin *b* diantara pigmen-pigmen klorofil. Klorofilid diserap dengan kuat pada puncak kolom. Klorofil murni dapat dielusi dari kolom, atau kolom dikeringkan dan pita dikeluarkan dengan spatula panjang, atau gula diteteskan dari pipa kolom dengan tekanan udara, pita dikeluarkan dan pigmen dilarutkan dalam eter. Strain (1958) dan Hynninen (1973) memisahkan isomer klorofil *a'* dan *b'* dari klorofil menggunakan kolom gula. Strain (1958) juga memisahkan produk oksidasi yang terbentuk pada daun gandum yang diinkubasi dengan aseton serta semua produk oksidasi yang muncul pada alomerisasi klorofil dalam metanol.

Stainer dan Smith (1960) menggunakan gula untuk menyiapkan klorobium klorofil 650 dan 660 dari perbedaan turunan *Chlorobium thiosulfatophilum*. Untuk klorofil 650, kolom dikembangkan dengan 40% dietil eter dalam hidrokarbon rantai pendek, sedangkan klorofil 660 pelarut pengembangannya adalah 50% eter dalam hidrokarbon rantai pendek.

Petkins dan Roberts (1962) mempergunakan kolom gula untuk memurnikan klorofil, feofitin dan feoforbid dalam penentuan aktifitas spesifik. Pelarut pengembangannya adalah 0,5% isopropanol dalam hidrokarbon rantai pendek untuk klorofil dan feofitin, serta campuran hidrokarbon rantai pendek: kloroform: isopropanol (69,5:30:0,5 v/v) untuk feoforbid dan pirofeoforbid. Ekstrak aseton cemara yang tak bermanfaat, mengandung senyawa-senyawa yang larut dalam eter, mencegah klorofil diserap oleh gula dan dikembangkan ada kromatogram.

Tan dan Francis (1962) menggunakan kolom yang tersusun atas 70% gula halus dan 30% tepung jagung (Melojel) untuk memisahkan klorofil dan feofitin secara kuantitatif dari ekstrak bayam yang telah diproses. Karoten dicuci dari kolom dengan hidrokarbon rantai pendek. Feofitin *a* dielusi dengan 2% aseton dalam hidrokarbon rantai pendek sedangkan klorofil dengan aseton.

Selulosa. Serbuk selulosa dapat digunakan untuk kromatogram lapis tipis, dan memberikan hasil yang cukup memuaskan. Kolom serbuk kering disiapkan, atau serbuk dimasukkan ke dalam adonan (*slurry*) dengan hidrokarbon rantai pendek dan ditekan pada tekanan rendah. Jalannya pigmen pada kromatografi mirip pada kolom gula dengan palrut pengembang yang sama (hidrokarbon rantai pendek yang mengandung 0,5% n-propanol atau sedikit aseton). Secara sederhana, klorofil *a* dan *b* dapat dipisahkan sempurna pada kolom tunggal.

Jeffrey (1963, 1972) menggunakan serbuk selulosa dalam pemisahan awal klorofil *c* dari ekstrak alga. Pigmen dipisahkan dengan 0,5% n-propanol dalam hidrokarbon rantai pendek sedangkan karoten, klorofil *a* dan xantofil dicuci melewati klorofil *c* daun pada pita di puncak kolom.

Kaplan dan Silberman (1959) memurnikan bakterioklorofil dan salah satu klorobium klorofil pada kolom serbuk selulosa menggunakan pelarut-pelarut yang jenuh H₂S. Untuk bakterioklorofil, kromatogram dikembangkan dengan 20% bensin dalam hidrokarbon rantai pendek. Untuk korobium klorofil, pelarut pengembangnya adalah hidrokarbon rantai pendek, sedangkan klorofil dielusi dengan 2% isopropanol dalam hidrokarbon rantai pendek.

Polietylen. Anderson dkk (1960) memperkenalkan penggunaan polietylen bubuk untuk pemisahan klorofil dari pigmen lainnya pada ekstrak daun dan alga, serta memisahkan klorofil *a* dan *b*. Serbuk polietylen memiliki keuntungan dibandingkan penjerap lainnya, karena pigmen-pigmen dapat dipisahkan dengan serbuk polietylen menggunakan ekstrak kasar suatu bahan tanpa mentransfernya ke dalam pelarut lain. Keuntungan lainnya adalah bahwa pigmen keluar dari kolom dengan urutan yang berlawanan bila dibandingkan dengan menggunakan gula dan selulosa.

Jones (1963a, b) mempergunakan polietylen untuk mendapatkan vinifeoporphirin *a*, monometil ester dari kotiledon buncis yang tumbuh di tempat gelap dan untuk memisahkan pigmen dari *Rhodospseudomonas spheroides*. Houssier dan Sauer (1969) memisahkan pigmen protoklorofil dari kulit biji labu dengan kombinasi kromatografi polietylen dan gula. Perkins dan Roberts (1964) menyiapkan klorofil *a* murni dari daun gandum menggunakan kolom serbuk polietylen. Jeffrey (1969) memisahkan 2 komponen *c*₁ dan *c*₂ dari klorofil *c* menggunakan polietylen secara spektroskopis. Berbagai macam jenis serbuk polietylen disediakan oleh Dow Chemical Co. Ltd yang selalu digunakan oleh beberapa peneliti. Hasil yang diperoleh dengan percobaan resin QX2187 dikembangkan oleh Holden (1965a). Bahan yang sama juga digunakan oleh Richards dan Rapoport (1966, 1967) untuk memisahkan porpirin dari *Chlorobium thiosulfatophilum* 660 ketika melakukan biosintesis klorobium klorofil 660. Serbuk polietylen tidak menunjukkan reaksi dengan cara yang sama seperti penggunaan aslinya. Jeffrey (1972) menunjukkan masalahnya ketika memisahkan klorofil *c*₁ dan *c*₂. Serbuk polietylen “ untuk analisis kromatografi ” yang disediakan oleh British Drug Houses Ltd telah diuji dalam laboratorium kami. Ketika digunakan dengan larutan aseton, serbuk polietylen memberikan laju yang sangat lambat pada kolom dan menyebabkan terbentuknya klorofil teroksidasi. Untuk mengkondisikan kolom dengan laju aliran yang cukup, satu bagian angka ini dicampur dengan 2 bagian serbuk polietylen yang memiliki densitas rendah (British Drug Houses Ltd). Pigmen dalam 65% larutan aseton dimasukkan ke dalam kolom, dan kromatogram dikembangkan pertama kali dengan 65% aseton, kemudian dengan 85%. Sedikit tekanan dari udara dimasukkan pada puncak kolom. Klorofilid keluar pertama kali, diikuti dengan feoforbid, kemudian fraksi xantofil. Klorofil turun dengan lebih lambat dan untuk mengelusnya dalam jumlah sedikit, pelarut pengembang diubah menjadi 80%. Feofitin merupakan pigmen terakhir yang keluar, sedangkan karoten tersisa pada puncak kolom. Saat ini, pemisahan klorofil dan klorofilid (atau feofitin dan feoforbid) dilakukan dengan metode ini untuk penentuan klorofilase sebagai pengganti partisi antara larutan aseton dan petroleum eter yang digunakan sebelumnya (Holden, 1961).

Sephadex dan Sepharose. Sephadex dan Sepharose adalah nama komersial dari resin filtrasi gel yang diproduksi oleh Pharmacia Fine Chemicals Company. Sephadex adalah gel berbentuk bola yang dibuat dari reaksi *cross-linking* antara dekstran dan epiklorohidrin. Gel tersebut bersifat sangat hidrofilik

karena memiliki jumlah gugus hidroksi yang banyak. Sephadex stabil dalam air, larutan garam, pelarut organik, dan larutan asam atau basa. Sedangkan Sepharose adalah gel berbentuk bola yang dibuat dari agarosa melalui proses pemurnian untuk menghilangkan polisakarida bermuatan. Sepharose stabil dalam air dan larutan garam dengan pH antara 4 s.d. 9 dan tanpa adanya agen pengoksidasi. Downey dkk (1970) serta Shimizu (1971) meneliti penggunaan kolom Sephadex LH-20 untuk memisahkan pigmen kloroplas. Dengan kloroform, dilanjutkan dengan campuran kloroform-metanol, Shimizu memperoleh pemisahan klorofil yang baik dari produk degradasinya, namun bukan pigmen spesifik seperti klorofil *a* dan *b*. Dia menyarankan bahwa kromatografi dengan penjerap ini cocok untuk pemisahan pigmen selama penentuan klorofilase. Sephadex LH-20 tampaknya tidak memberikan keuntungan yang pasti dibandingkan penjerap lainnya, dan penggunaan penjerap yang lebih murah seperti polietilen, tampaknya lebih disukai. Sepharose CL-6B digunakan sejak 1981 untuk preparasi klorofil sebagai alternatif yang baik dibandingkan Sephadex LH-20. Separasi yang dihasilkan Sepharose CL-6B cukup baik dengan menggunakan pelarut 2-propanol dengan konsentrasi bertingkat dalam heksan (Iriyama et al., 2006).

Kromatografi Kertas

Kromatografi kertas saat ini hampir sepenuhnya digantikan oleh kromatografi lapis tipis untuk memisahkan klorofil dalam skala kecil beserta produk-produk turunnya. Sestak (1959) meninjau kembali metode kromatografi kertas untuk pemisahan pigmen kloroplas. Lalu Sestak (1965) mempublikasi tinjauan kedua metode tersebut sampai tahun 1964. Selanjutnya beberapa makalah mengembangkan metode baru seperti pemisahan pada kertas. Diantara beberapa makalah yang disebutkan tersebut, terdapat satu metode pemisahan pigmen fitoplankton (Jeffrey dan Allen, 1967). Sherma (1970) meneliti penggunaan kertas yang diisi silika gel atau aluminium hidroksida untuk pemisahan pigmen daun. Meskipun cara ini potensial untuk karotenoid, namun cara ini tidak memuaskan untuk klorofil karena terdapat lapisan dan perubahan pigmen.

Belum tentu orang masih mau menggunakan kromatografi kertas jika dibandingkan kromatografi lapis tipis untuk pemisahan klorofil dan produk degradasinya. Keterangan lebih lengkap dapat diperoleh dari makalah Strain dan kawan-kawan (misalnya Strain dkk., 1965).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis menggantikan kromatografi kertas, merupakan pilihan metode yang modern untuk pemisahan dan penentuan klorofil beserta produk degradasinya dalam skala kecil. Dengan lapisan yang tipis, KLT juga dapat digunakan untuk membuat preparasi skala kecil. Saat ini teknologi KLT sudah sangat maju menjadi kromatografi lapis tipis performansi tinggi (KLT-PT) yang dilengkapi dengan *autosampler* yang dapat mengaplikasikan sampel dengan presisi dengan volume 0.1 s.d. 5 μL , sistem pengembang terstandar yang bersifat dapat diulang (*reproducible*), perangkat lunak untuk kontrol dan evaluasi, dan hasil gambar digital yang representatif untuk publikasi. Salah satu produk KLT-TP dapat dilihat di website berikut: https://www.camag.com/en/tlc_hptlc.cfm.

Berikut adalah sekilas tentang penggunaan KLT pada analisa pigmen yang telah dilakukan sejak lama. Untuk mendapatkan pigmen pekat, pelarut harus dievaporasi, terutama dengan aliran gas nitrogen. Intensitas cahaya yang rendah harus dipertahankan saat pemekatan dan penotolan pigmen, demikian juga ketika mengambil pita pigmen yang telah terpisahkan saat pengembangan. Kromatogram juga harus dikembangkan dalam ruang pengembangan. Kromatogram juga harus dikembangkan dalam ruang gelap dan seluruh perlakuan harus dilakukan dengan cepat. Selama ini, penentuan kuantitatif dengan kromatografi 2 langkah sering tidak berhasil, meskipun Jeffrey (1968) telah menegaskan bahwa 95% lapisan sukrosa dapat diperoleh kembali. Penggunaan tangki yang sempit sangat menguntungkan, karena selain ekonomis terhadap pelarut juga memberikan resolusi campuran dan pelebaran pita (*tailing*) yang dapat dikurangi.

Beberapa makalah (misalnya Hager dan Meyer-Bertentrath, 1966; Riley dan Wilson, 1965) telah melaporkan penggunaan silika gel atau lapisan *kieselguhr* untuk pemisahan pigmen kloroplas. Bacon (1966) menunjukkan dengan jelas bahwa penjerap-penjerap tersebut, terutama silika gel, besar

kemungkinan menyebabkan pembentukan produk-produk degradasi klorofil (Bacon dan Holden, 1967) yang identik dengan pigmen yang biasa ditemukan pada daun yang telah diproses. Garside dan Riley (1969) mengembangkan metode Riley dan Wilson (1965) menggunakan silika gel untuk penentuan kuantitatif pigmen tanaman pada air laut dan biakan alga. Mereka menegaskan bahwa ketika melakukan penelitian, mereka “tidak dapat mendeteksi beberapa produk dekomposisi pigmen yang lebih labil”. Seliskar (1966) memisahkan protoklorofil dan protoklorofilid daun buncis pada silika gel H dengan campuran pelarut bensin-etil asetat dalam perbandingan 8:2:0,5 sampai 8:2:3. Rebeiz dkk (1970) juga menggunakan metode ini ketika meneliti biosintesis protoklorofil pada kotiledon mentimun.

Bacon (1965) mengembangkan pemisahan klorofil dan senyawa-senyawa turunannya pada lapis tipis selulosa. Artefak tidak ditemukan pada penjerap ini dan merupakan cara yang mudah untuk dilakukan. Beberapa penelitian menggunakan KLT pada kaca mikroskop untuk mengontrol adanya produk kerusakan klorofil dalam ekstrak. Pelaut pengembang yang biasa digunakan adalah hidrokarbon rantai pendek:aseton:n-propanol (90:10:0,45). Dengan campuran pelarut ini, feofitin bergerak lebih cepat, diikuti dengan klorofil, feoforbid dan terakhir klorofilid; dan pigmen *a* bergerak lebih cepat daripada pigmen *b*. dengan pelarut pengembang methanol:diklorometana:air (100:18:20), seperti yang digunakan oleh Schneider (1966, 1968) pada lapisan selulosa, pigmen bergerak dengan urutan terbalik. Buckle dan Edwards (1969) memisahkan produk degradasi klorofil dari sup kacang polong dengan metode Bacon.

Jeffrey (1968) menggunakan selulosa untuk pemisahan klorofilid dan feoforbid dengan pelarut pengembang hidrokarbon rantai pendek:aseton (80:20) (Bacon dan Holden, 1967), namun umumnya lebih menyukai lapisan sukrosa dalam pemisahan pigmen-pigmen alga; Jeffrey juga menjelaskan secara panjang lebar tentang penyiapan pelat KLT sukrosa. Ellsorth dan Nowak (1973) menggunakan KLT pada pelabelan 14C. Houssier dan Sauer (1969) mengembangkan jalannya kromatografi pigmen protoklorodil dari biji labu dengan lapis tipis selulosa, sukrosa dan manitol. Lapisan glukosa digunakan oleh Madgwick (1965, 1966) serta Riley dan Wilson (1967) untuk pigmen dan penggunaan lapisan polietilen dalam pemisahan klorofil *c*1, *c*2 serta turunan klorofil *c*.

Penggunaan KLT fase terbalik telah diteliti dalam dua penelitian yang sudah lama. Jones dkk (1972a, b) menguji metode ini untuk mengidentifikasi klorofil produk-produk kerusakannya serta kompleks seng dan tembaga dengan feofitin dan feoforbid ketika terdapat dalam satu campuran. Lapisan serbuk gula, *kieselguhr* dan campuran *kieselguhr*-silika gel G yang dipenuhi minyak digunakan dengan campuran pelarut pengembang yang terdiri dari metanol dan aseton dengan variasi jumlah air. Kromatogram direkam pada film polikromatik di bawah sinar ultra violet (Jones dkk., 1967). Dalam penelitian tersebut, mereka menemukan terbentuknya artefak pada lapisan anorganik; dan hal ini tampaknya terjadi pada bagian pelat tempat di mana pigmen digunakan dan lapisan yang tidak dipenuhi dengan minyak.

Daley dkk (1973) menggunakan *kieselguhr* G yang diisi dengan triolein, minyak jarak atau minyak parafin untuk memisahkan produk-produk degradasi klorofil. Dalam penelitian tersebut, mereka dapat memisahkan 18 produk yang dapat diidentifikasi dan 8 turunan klorofil *a*, *b*, dan *c* yang tidak diketahui, serta minimal 6 turunan bakterioklorofil. Pigmen diaplikasikan pada bagian pelat yang tak diisi, dan selama penentuan kuantitatif, penotolan dilakukan dalam kotak plexiglass yang dilewati aliran nitrogen. Tiga sistem pemisahan utama yang dikembangkan adalah: jarak rendah untuk feofitin, jarak sedang untuk klorofil dan jarak tinggi untuk feoforbid. Pada tiap-tiap sistem, terdapat perbedaan minyak yang digunakan dan perbedaan proporsi methanol, aseton, isopropanol, air dan bensin sebagai pelarut pengembang. Daley dkk (1973b) mengembangkan suatu metode kuantitatif, untuk determinasi alga dan endapan turunan klorofil menggunakan KLT fase terbalik.

Lapisan tipis yang siap pakai baik sekali untuk digunakan meskipun sangat mahal daripada lapisan buatan sendiri. Sherma dan Lippstone (1969) membandingkan pemisahan pigmen kloroplas dari daun dan alga pada tipe-tipe kromatografi lapis tipis (selulosa, silika gel, alumina dan poliamida). Mereka hanya meneliti jalannya klorofil dan karotenoid yang tidak berubah, dan tidak meneliti pemisahan produk-produk degradasi klorofil. Lapisan alumina dan poliamida tidak cocok untuk klorofil. Lapisan silika gel tidak menyebabkan perubahan pigmen yang lebih besar daripada lapisan-lapisan yang dibuat

sendiri. Lapisan selulosa memberikan hasil yang paling memuaskan. Sherma (1970) menguji lapisan kieselguhr untuk kromatografi serapan dan kromatografi partisi fase terbalik. Dia tidak dapat menemukan sistem pelarut yang cocok untuk memberikan pemisahan klorofil dan karotenoid yang baik dari bayam atau *Chlorella* dengan kromatografi serapan. Hasil ini mirip dengan observasi sebelumnya dengan lapisan kieselguhr yang dibuat di laboratorium. Dengan kromatografi fase terbalik, Sherma memperoleh pemisahan pigmen yang baik dari *Chlorobium* dan *Rhodospirillum*. Chu dan Chu (1966) memisahkan porpirin-porpirin pada lapisan kromatografi silika gel.

Untuk penentuan pigmen secara kuantitatif pada pelat KLT, pita/totol harus dielusi dengan pelarut yang cocok (Jeffrey, 1968) dan spektranya bergerak, atau pelat dipetakan dengan fluorimeter (Daley dkk., 1973a, b) atau dipetakan dengan Chromoscan yang dapat memberikan grafik absorbansi atau refleksi cahaya yang mendekati panjang pelat. Mesin pengintegrasikan mengukur daerah di bawah pita yang memungkinkan untuk menghitung jumlah tiap-tiap pigmen (Garside dan Riley, 1969).

BAB 5 Metode Analitik Karotenoid

Metode-metode analitik karotenoid telah banyak diulas oleh Britton dan Goodwin (1971) serta De Ritter dan Purcell (1981), tetapi yang paling lengkap dari Davies (1976) dan kemudian masih terus berkembang sampai saat ini. Analisis karotenoid rumit karena ketidakstabilannya dan kecenderungan mereka untuk mengalami stereomutasi, ketidakstabilan terhadap cahaya dan suhu, serta oksidasi. Karotenoid dapat diubah oleh asam dan sebagian dirusak oleh enzim, khususnya oleh lipoksigenase.

Semua operasi analitik harus dilakukan pada cahaya samar-samar dalam lingkungan yang bebas oksigen (pada kondisi nitrogen atau vacuum). Pelarut-pelarut harus terlebih dahulu dimurnikan, suhu tidak boleh lebih dari 40°C dan sampel harus disimpan pada suhu sekitar -20°C dengan nitrogen. Isolasi karotenoid meliputi ekstraksi, saponifikasi, dan pemisahan. Identifikasi pigmen yang dipisah didasarkan pada sifat-sifat spektroskopik, kromatografi dan uji kimia. Spektroskopi massa, *circular dichroism* (CD), dan NMR sekarang menjadi metode rutin digunakan untuk identifikasi struktural karotenoid.

Ekstraksi

Karotenoid merupakan senyawa yang mudah terdegradasi oleh lingkungan. Oleh karena itu untuk mengekstraksi karotenoid, hal pertama yang harus diperhatikan adalah sampel. Sampel yang digunakan harus segar, tidak rusak dan berpenyakit, serta pengambilannya harus representatif.

Sebelum ekstraksi, bahan harus digiling atau dipotong kecil-kecil untuk memperbesar luas permukaan sampel agar terekstrak sempurna. Selain sampel, penggunaan pelarut ekstraksi juga perlu diperhatikan. Umumnya sampel masih dalam keadaan segar yang kandungan airnya masih tinggi, sehingga pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah pelarut organik yang dapat bercampur dengan air (*water-immiscible*), seperti aseton, metanol atau campuran antara aseton dan metanol. Namun, apabila bahan yang digunakan sudah kering dapat menggunakan pelarut eter maupun petroleum eter. Sebelum ekstraksi, zat antioksidan (seperti butylated hydroxytoluene (BHT)) dan agen penetral (seperti CaCO_3) perlu ditambahkan untuk mencegah kerusakan. Ekstraksi juga harus dilakukan secepat mungkin untuk menghindari degradasi oksidatif ataupun enzimatis.

Hasil ekstraksi tersebut disaring dan diulang beberapa kali sampai semua pigmen karotenoid terekstrak semua. Dari ekstrak kasar/mentah yang mengandung air pigmen ditransfer menjadi kepelarut yang tidak bercampur dengan air (seperti heksan, dietil eter) dengan menambahkan larutan NaCl jenuh yang cukup sampai kedua lapisan terpisah. Pemisahan tersebut dilakukan dengan menggunakan alat yang disebut corong pisah.

Saponifikasi

Saponifikasi merupakan prosedur pemurnian untuk menghilangkan lipid dan klorofil yang tidak diinginkan saat ekstraksi karotenoid. Metode saponifikasi digunakan untuk karotenoid yang stabil terhadap alkali. Namun, jika pigmen karotenoid tersebut labil terhadap alkali (seperti astaxanthin, fucoxanthin) atau karotenoid ester, saponifikasi tidak digunakan. Saponifikasi dilakukan dengan menambahkan KOH yang cukup dalam metanol atau etanol untuk mendapatkan konsentrasi KOH keseluruhan antara 5% hingga 10%. Metode saponifikasi yang lain dapat dilakukan dengan merebus larutan lemak selama 30 menit atau membiarkannya semalam pada suhu ruang dengan aliran gas N_2 .

Selanjutnya ekstrak yang disaponifikasi dipartisi dengan eter atau heksan dengan corong pemisah, dibersihkan dari alkali dengan menambah air, kemudian dikeringkan, dan diuapkan dalam vakum. Untuk menghilangkan sisa air yang masih bercampur dapat menggunakan natrium sulfat (Na_2SO_4).

Penentuan kuantitatif

Metode standar penentuan kuantitatif bersifat spektrofotometrik dan mirip dengan penentuan klorofil. Absorbansi dan koefisien ekstinsi dari volume larutan karotenoid yang diketahui ditunjukkan pada panjang gelombang penyerapan maksima. Jumlah karotenoid dalam mikrogram per gram bahan diberikan dengan rumus berikut:

$$\mu g \text{ karotenoid/g} = \frac{A \times V \times 10^6}{A_{1cm}^{1\%} \times 100 \times G} \quad (5.1)$$

A	= absorbansi maksimum
V	= volume (ml)
G	= berat sampel (gram)
$A_{1cm}^{1\%}$	= 2500 (karotenoid campuran)

Total karotenoid dalam kloroplast yang ditemukan pada daun hijau dapat ditentukan dari ekstrak daun yang tidak disaponifikasi bersamaan dengan klorofil dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang maksima penyerapan klorofil dan panjang gelombang dimana karotenoid menyerap dengan kuat dan kedua klorofil menyerap sedikit, seperti 470 nm.

Selain menggunakan persamaan di atas, determinasi karotenoid dapat juga diukur dengan menggunakan persamaan Linchtenthaler, Persamaan tersebut adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Chl a} &= 10,05 A_{660,6} - 0,97 A_{642,2} \\ \text{Chl b} &= 16,36 A_{642,2} - 2,43 A_{660,6} \\ \text{Total Chl} &= 7,62 A_{660,6} + 15,39 A_{642,2} \end{aligned}$$

$$\text{Total karotenoid} = \frac{1000 A_{470} - 1,43 \text{ klorofil a} - 35,87 \text{ klorofil b}}{205} \quad (5.2)$$

Menghilangkan sterol

Sterol yang mungkin ada pada jumlah yang besar pada beberapa ekstrak dan mungkin mengganggu prosedur kromatografi dapat dihilangkan dengan pengendapan pada pelarut yang berbeda-beda. Setelah penentuan total karotenoid, ekstrak diuapkan dalam vakum dan bahan disaponifikasi dilarutkan dengan sedikit pelarut, seperti: metanol, petroleum eter, atau aseton dan dibiarkan semalam pada suhu -20°C . Selanjutnya, sterol dihilangkan dengan sentrifugasi (pemisahan) dengan bahan pemisah yang didinginkan.

Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik terpenting dalam metode analisis karotenoid. Sejumlah absorbansi digunakan untuk kromatografi karotenoid, diantaranya sukrosa, selulosa, kanji, CaCO_3 , Ca(OH)_2 , CaO , MgCO_3 , MgO , ZnCO_3 , Al_2O_3 , gel silika, kieselguhr, dan dapat juga campuran dari absorbansi tersebut. Pemilihan absorbansi didasarkan menurut jenis karotenoid yang akan dipisahkan karena adsorben yang berbeda akan mencapai pemisahan dengan cara yang berbeda.

Kelompok hidrokarbon, monohidroksi dan polihidroksi karotenoid dapat dipisahkan dengan alumina atau silika. Untuk absorbansi MgO dan Ca(OH)_2 , dapat digunakan untuk pemisahan berdasarkan jumlah dan jenis ikatan rangkap pada molekul. Pada rangkaian karoten, likopen paling kuat terserap diikuti oleh neurosporene dan ξ -karoten. Karoten siklik dengan ikatan rangkap pada cincin diserap lebih sedikit daripada karotenoid linear. β -karoten mempunyai kromofor yang lebih panjang daripada α -karoten, sehingga β -karoten lebih terserap. Isomer cis-trans karotenoid dapat dipisahkan dengan absorbansi Ca(OH)_2 dan ZnCO_3 .

Kolom Kromatografi

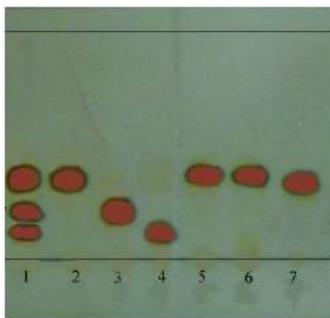
Kolom kromatografi karotenoid pertama kali dimulai oleh Tswett (1906) dan dikembangkan setelah 25 tahun oleh Kuhn dan Lederer (1934) selanjutnya diteruskan oleh Zechmeister (1934) dan Strain (1941).

Kromatografi kolom dapat dikemas dengan menggunakan adsorben seperti alumina atau gel silika sebagai fase diamnya, sedangkan untuk fase geraknya menggunakan pelarut. Pigmen dielusi pelarut dengan polaritas yang meningkat (nonpolar terlebih dahulu). Polaritas dari pelarut diubah setelah pita yang berwarna dielusi secara sempurna.

Adsorben lain (seperti: MgO, CaCO₃, gula, selulosa) dapat dikemas kering. Untuk meningkatkan pemisahannya sebuah alat penyaring seperti Hyflo Super Cel atau Celite dicampur dengan adsorben dengan proporsi yang beragam (30%-60% dari berat). Jenis kolom ini dapat dielusi dengan cara elusitation, tetapi biasanya digunakan daerah kromatografi. Pelarut dialirkan melalui kolom kromatografi sampai bagian yang diwarnai terpisah. Adsorben (penyerap) kemudian dipisahkan dan bagian yang berwarna dipotong dan dielusi dengan pelarut.

Kromatografi Lapis Tipis

Prinsip dari kromatografi lapis tipis (KLT) sama dengan kromatografi kolom. KLT telah berhasil digunakan pada pemisahan dan pemurnian karotenoid. Metode tersebut dapat digunakan sendiri untuk sampel dengan jumlah kecil atau dikombinasikan dengan kolom kromatografi. Dengan kolom kromatografi, karotenoid pertama dipisahkan menjadi fraksi-fraksi dengan polariti yang berbeda, yang kemudian dipisahkan menjadi karotenoid individual dengan KLT.



Gambar 51. Kromatografi lapis tipis dengan menggunakan silika gel. Ket: (1) karoten limbah serabut kelapa sawit; (2) fraksi 1, (3) fraksi 2, (4) fraksi 3 dari karoten hasil purifikasi limbah serabut; (5) karotenoid kelapa sawit segar; 6) karotenoid ekstrak wortel dan (7) marker β -karoten

Metode ini memungkinkan pemisahan yang cepat dan tepat. Umumnya digunakan pada skala mikro ataupun semimikro. Zat-zat pada lapisan yang sangat sedikit dapat dideteksi. Lapisan yang lebih tebal sampai 1,5 mm dapat juga digunakan pada skala preparatif. Adsorben yang paling banyak digunakan adalah silika gel. Selain itu juga digunakan CaCO₃ dan MgO. Adsorben ini tidak melekat pada plat kaca, mereka dicampur dengan pengikat/perekat seperti kalsium sulfat, kieselguhr, dan kanji.

Metode KLT didasarkan pada adsorpsi (penyerapan), berdasarkan dengan polaritas karotenoid, jumlah serta jenis ikatan rangkap pada molekulnya. Realita ini dilakukan pada lapisan kieselguhr, gel silika, selulose yang dipenuhi dengan parafin cair atau trigliserid pada sayuran, fase gerak dapat mengandung air. Pemisahan dengan kromatografi cocok untuk karotenol ester yang epifasik dan terserap secara lemah. Sehingga mobilitas ester dikorelasikan dengan sifat asam lemak yang mengesterifikasi.

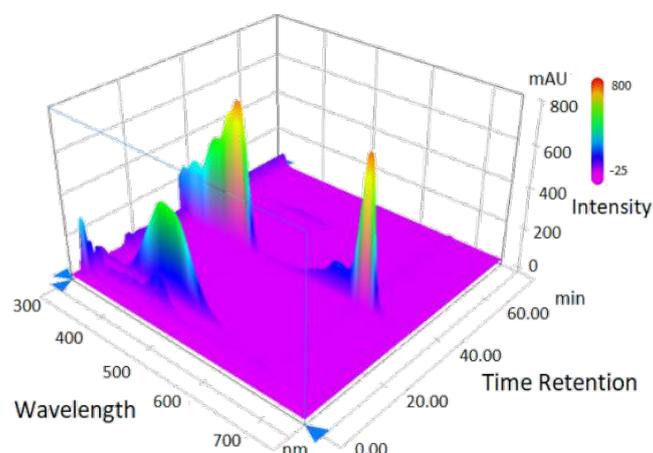
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Awalnya KCKT digunakan untuk analisis pigmen hijau dengan perkembangan selanjutnya dapat digunakan untuk analisis karotenoid, untuk mengganti metode standar dari kromatografi kolom dan KLT. Metode tersebut dapat dilakukan dengan cepat, dapat direproduksi, dan sangat sensitif. Pemisahan, identifikasi, dan kandungan karotenoid dicapai secara bersamaan. Alat yang modern mengandung sebuah pompa untuk mencapai tekanan tinggi, kapasitas elusi gradien, dan sebuah detektor UV yang dapat dilihat, merupakan scanning spektrofotometer untuk menentukan spektra serapan dari karotenoid yang dipisahkan. Pigmen-pigmen diidentifikasi dengan waktu tambat dan dikuantifikasi dengan luas puncak area atau ketinggian puncak. Batas deteksi dalam rentang nanogram (Taylor, 1983).

Adsorben yang digunakan sama dengan kolom kromatografi, yakni magnesium oxide untuk karoten dan silika berpori (seperti: Zorbax SIL, porasil, LiChrosphere) untuk xantofil. Pelarut dengan fase normal secara rutin mengandung hexane atau petroleum eter dengan konsentrasi rendah atau meningkat dari pelarut polar. Kolom dengan fase yang dibalik mengandung octyl (C8)- atau octadecyl (C18)-silylated silika gel, seperti Bondapack C18, Partisil ODS, Vydac ODS, Permaphase ODS, dan lainnya. Sistem pelarut dengan fase terbalik adalah campuran air atau buffer dalam alkohol (methanol) atau asetonitrile.

Perkembangan KCKT merupakan suatu terobosan untuk analisis karotenoid salah satunya adalah dengan menggunakan detektor PDA. Pada KCKT dengan detektor UV-tampak konvensional, pengukuran hanya dapat dilakukan pada satu panjang gelombang, sehingga untuk menentukan komposisi suatu sampel pada banyak panjang gelombang harus dilakukan pengukuran berulang-ulang. Hal ini berbeda dengan KCKT detektor PDA, pengukuran dapat dilakukan pada banyak panjang gelombang secara simultan, sehingga dapat diperoleh komposisi suatu sampel pada rentang panjang gelombang yang diinginkan. Keunggulan lain, rentang panjang gelombang dapat menghasilkan pola spektra dari puncak-puncak yang diperoleh sehingga secara kualitatif dapat ditentukan tanpa harus menganalisis marker (Briton, 1995; Choo, 1994).

Penggunaan detektor PDA memberikan beberapa kemudahan. Dengan hanya sekali analisis dapat diperoleh kromatogram pada tiap-tiap panjang gelombang sesuai interval yang dipilih (200-800nm), sehingga diperoleh pola spektra dari tiap-tiap puncak. Pola spektra ini membantu dalam mengidentifikasi secara kualitatif jenis karotenoid dari tiap puncak tanpa harus menganalisis marker. Jika dibandingkan dengan detektor UV-Tampak konvensional, sekali analisis memerlukan marker sebagai pembanding dan hanya dapat diamati pada satu panjang gelombang. Dapat dibayangkan jika suatu sampel yang terdiri dari 10 komponen, maka diperlukan 10 marker untuk mengidentifikasinya.



Gambar 52. Kromatogram tiga dimensi (3D) KCKT dengan deteksi PDA pada kisaran penyerapan uv-tampak dari sampel rumput laut terlihat bahwa spektrum karotenoid pada menit-menit awal dapat dipisahkan dengan baik dari klorofil.

Identifikasi Karotenoid

Karotenoid dapat diidentifikasi atas dasar sifat kromatografi dan spektrofotometrinya. Kekuatan penyerapannya ditentukan oleh panjang kromatografi dan polaritas dari kelompok gugus fungsional yang dimiliki. Menurut Davies (1976) berbagai faktor yang mempengaruhi mobilitas pigmen pada KLT ditentukan dengan nilai Rf.

Spektrum penyerapan dari masing-masing pigmen yang murni secara kromatografi dicatat dan dibandingkan dengan nilai-nilai dari literatur (Davies, 1976). Perbedaan nilai yang kecil yang dapat muncul pada literatur tergantung dari ketelitian kromatografi. Untuk penentuan kuantitatif dari masing-masing pigmen, koefisien ekstinsi ditunjukkan pada penyerapan maksima, dan koefisien kepunahan yang dicatat digunakan dalam kalkulasi.

Untuk menentukan sifat dari isomer geometrik menggunakan stereomutasi diinduksi oleh fotoisomerisasi katalis iodine. Pigmen dilarutkan pada petroleum eter dan ditambah beberapa tetes larutan iodine kemudian dipaparkan pada cahaya. Jika pigmen all-trans isomer akan terjadi pergeseran hipsokromik, sementara itu cis isomer memberikan pergeseran batokromik. Isomer-isomer dapat dipisahkan secara kromatografi. Suatu cis isomer berbeda dari all-trans dalam kekuatan penyerapannya terhadap spektrum elektronik.

Jika pigmen akhirnya teridentifikasi, test utama untuk menguatkan identifikasi/golongannya adalah uji kromatografi. Pigmen yang tidak diketahui dicampur dengan karotenoid marker dan dikromatografikan. Metode tersebut merupakan petunjuk yang jelas bahwa mereka identik jika dua pigmen tidak memisah pada penerapan yang berbeda dikembangkan dengan pelarut yang berbeda. Saat ini, untuk mengidentifikasi karotenoid, MS digunakan untuk menentukan berat molekuler, spektroskopi NMR digunakan untuk stereokimia ikatan rangkap, dan spektroskopi IR untuk mengidentifikasi kelompok fungsional dan karakter rantai poliena.

Uji Kimia Karotenoid

Uji kimia karotenoid dapat dilakukan untuk memperjelas identifikasi yang kita lakukan. Uji ini relatif cepat dan singkat, hanya mereaksikan dengan reagen atau pereaksi kimia maka dapat diketahui golongan karotenoidnya.

Uji karoten dengan reaksi Carr-Price

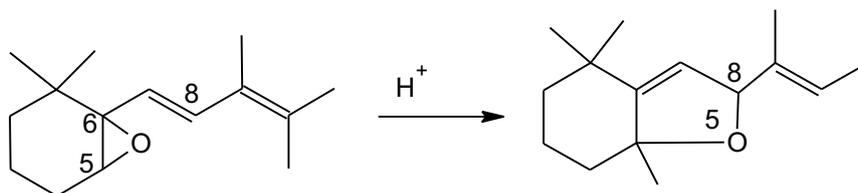
Karotenoid dibedakan menjadi 2 golongan, yaitu: karoten dan xantofil, serta ada yang bersifat provitamin A dan non provitamin A. Metode dengan reaksi Carr-Price ini dilakukan untuk melihat karotenoid yang diidentifikasi merupakan golongan karoten provitamin A atau bukan. Uji ini dapat dilakukan dengan melarutkan karotenoid pada pelarut organik (misal: heksan) kemudian diberi beberapa tetes reagen Carr-Price. Reagen tersebut berupa larutan 10% antimon klorida dalam kloroform. Akhir reaksi perlu ditambahkan H₂SO₄ untuk mengetahui perubahan warnanya. Reaksi positif mengandung karoten provitamin A, apabila terjadi perubahan warna dari kuning menjadi biru.



Gambar 53. Uji kimia karotenoid sebelum (kiri) dan sesudah (kanan) ditambah reagen Carr-Price

Uji gugus epoksida

Isomerisasi dari 5,6-epoxide menjadi 5,8-epoxide terjadi dengan cepat, bahkan dengan dielusi asam akan diperoleh adanya bekas.



Gambar 54. Isomerisasi 5,6-epoxide menjadi 5,8-epoxide karena asam

Reaksi yang berlangsung sangat cepat, dengan penambahan asam akan terjadi perubahan hipsokromik pada spektrum serapannya. Perubahan 20 nm menunjukkan adanya satu kelompok gugus epoksida, sementara perubahan 40 nm menunjukkan adanya dua kelompok tersebut.

Reaksi tersebut juga menghasilkan warna yang bervariasi dari hijau untuk 5,6-epoxide sampai biru tinta untuk 5,8-epoxide. Kelompok yang kedua hanya memberikan reaksi warna. Uji epoksida yang cepat adalah dengan melakukan kromatografi lapisan tipis dan diuapkan dengan gas HCl selama beberapa menit.

Uji gugus karbonil

Reduksi gugus fungsi karbonil dapat dilakukan dengan hidrid metal – litium aluminium hidride pada etil atau sodium borohydride pada etanol. Tingkat reduksi dapat dilihat dari pergeseran hipsokromik, yang kemungkinan besar pergeserannya. Perubahan hipsokromik dari sekitar 6 nm sampai 7 nm menunjukkan suatu cincin karbonil. Suatu perubahan dari 25 nm sampai 35 nm menunjukkan suatu rantai karbonil. Warna tampak berubah menjadi warna-warna yang lebih terang dan struktur yang khas muncul kembali pada spektrum.

Uji gugus hidroksi

Esterifikasi

Kelompok hidroksi primer dan sekunder di acetilkan pada suhu kamar dengan anhidrid dan piridin kering, tetapi kelompok hidroksi tersier tidak bereaksi pada kondisi ini. Jika reaksi diamati secara kromatografi, jumlah hidroksi yang dapat diacetilkan ditunjukkan pada jumlah asetat intermedier yang terlihat. Monol memberikan monoasetat, sebuah diol satu acetat intermedier. Namun, molekulnya simetrik atau suatu campuran dan sebuah triol, tiga monoasetat dan tiga diasetat.

Silitasi

Kelompok hidroksi tersier juga dapat diubah menjadi trimetil ester. Hidroksi yang terhalang secara sterik tidak dapat disilitasi. Kelompok hidroksi tersier dapat ditentukan melalui silitasi dari produk yang diacetilkan secara penuh.

Uji Alilik Hidroksi

Kelompok hidroksi alilik dapat didehidrasi oleh perlakuan dengan kloroform yang diasamkan. Pembentukan ikatan rangkap tambahan menyebabkan perubahan batokromik karena kromofornya. Kelompok hidroksi alilik mengalami metilasi yang lebih mudah daripada alkohol lainnya. Perlakuan dengan metanol dan HCl pada suhu kamar, akan membentuk metil eter.

Karoten Ester

Untuk menyelidiki karoten ester, saponifikasi dihilangkan. Hidrolisis dari ester berlangsung pada suhu kamar pada larutan alkalin yang lemah (1-5%). Kinetik dari reaksi dapat diamati secara kromatografi

karena perubahan-perubahan yang signifikan pada polaritas. Xantofil menjadi lebih polar daripada ester yang tidak polar.

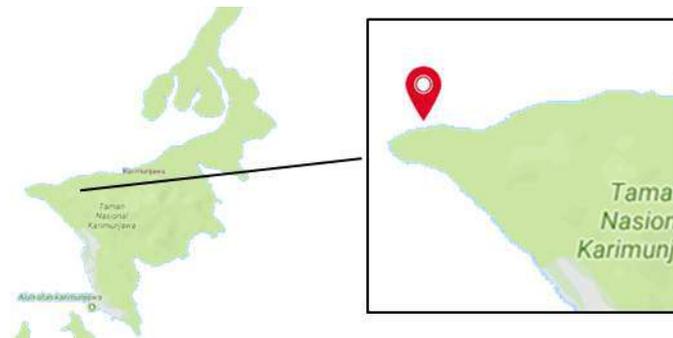
BAB 6 Proyek mini mahasiswa

Analisa Komposisi dan Kandungan Pigmen Dominan Pada *Padina australis* dan *Padina gymnospora* yang Dikoleksi dari Sunset Beach, Kepulauan Karimunjawa, Indonesia (dikerjakan dan dilaporkan oleh Gita Claudia)

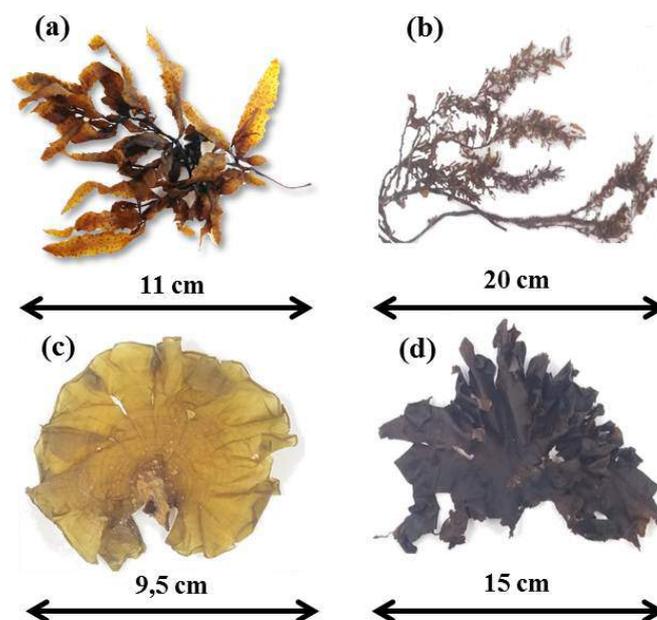
Bahan dan metode

Sampel

Empat jenis rumput laut coklat, yaitu *Sargassum (S.) polycystum*, *S. crassifolium*, *Padina (P.) australis*, dan *P. gymnospora*, dianalisa komposisi dan kandungan pigmen utama menggunakan spektrofotometer UV-Tampak dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Rumput laut yang digunakan pada penelitian ini dikoleksi dari Sunset Beach, Kepulauan Karimunjawa ($-5^{\circ}50'19.57038''S$, $110^{\circ}24'48.38974''E$) (Gambar 55) dengan morfologi seperti yang dapat dilihat pada Gambar 56.



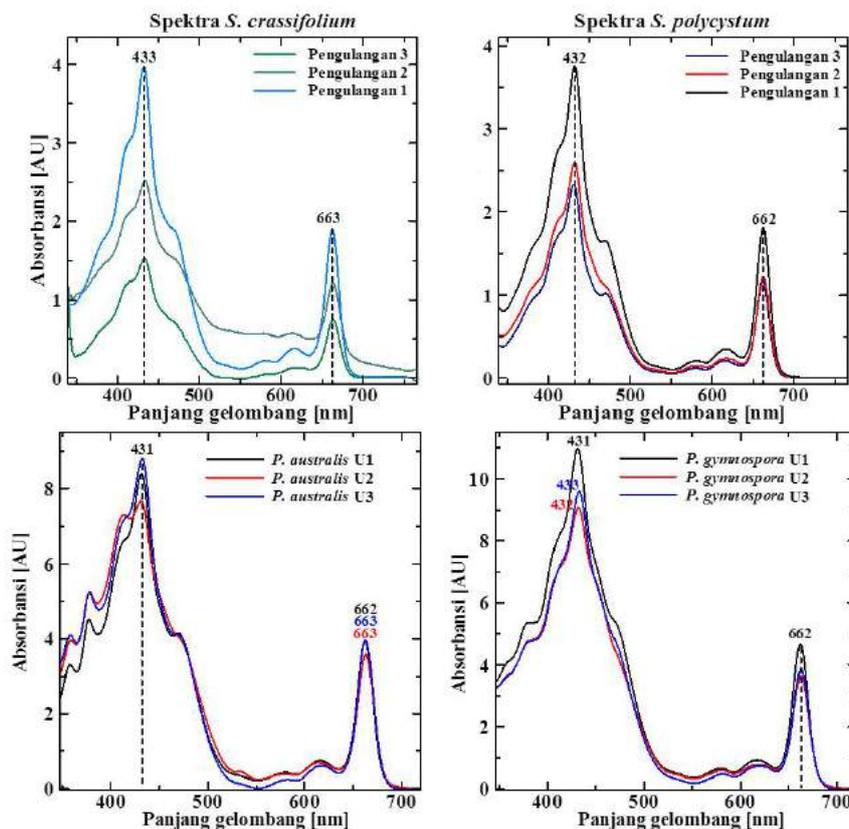
Gambar 55. Peta lokasi pengambilan sampel rumput laut coklat di Sunset Beach, Kepulauan Karimunjawa, Indonesia.



Gambar 56. Foto 4 jenis rumput laut coklat, *S. polycystum* (a), *S. crassifolium* (b), *P. australis* (c), dan *P. gymnospora* (d) dengan informasi mengenai ukuran dari setiap jenis rumput laut.

Jenis rumput laut tersebut diidentifikasi berdasarkan morfologi yang dibandingkan dengan database rumput laut pustaka acuan.

Spektra serapan dari ekstrak pigmen kasar dari empat jenis rumput laut cokelat menunjukkan pita serapan pigmen klorofil a pada panjang gelombang 431-433 nm (pita solet) dan 662-663 nm (pita Qy), serta serapan karotenoid sekitar 400-500 nm saling tumpang tindih dengan pita solet klorofil (Gambar 57).



Gambar 57. Spektra serapan ekstrak pigmen dari 4 jenis rumput laut, *S. crassifolium*, *S. polycystum*, *P. australis* dan *P. gymnospora*, dalam aseton. Nilai absorbansi dalam 1 g berat kering rumput laut.

Ekstraksi Pigmen

Satu spesies rumput laut cokelat segar dicuci dengan air bersih, disortir bagian yang tidak diperlukan, kemudian dikeringkan dengan tissue. Setelah kering, rumput laut cokelat dihancurkan dengan mortal dengan penambahan nitrogen cair, kemudian dibiarkan hingga suhunya mencapai suhu ruang. Serbuk rumput laut cokelat diambil sedikit dan diukur kadar airnya menggunakan moisture analyzer. Sebanyak 0,1 gram rumput laut cokelat halus yang sudah mencapai suhu ruang dalam eppendorf diberi sodium askorbat dan CaCO_3 secukupnya. Ke dalam eppendorf ditambahkan 1 mL campuran pelarut aseton dan metanol (3:7, v/v). Larutan diekstraksi dengan vortek selama 1 menit dan diletakkan dalam es selama 1 menit. Langkah ini diulang hingga 3 kali. Pemisahan ekstrak pigmen dari residu dilakukan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dipisahkan dari residu, kemudian ditampung di vial. Residu yang masih mengandung pigmen diekstraksi kembali dengan prosedur yang sama hingga 3 kali untuk mengangkat semua pigmen yang masih tertinggal di residu. Hasil supernatan ditampung dalam vial yang sama dan dikeringkan dengan gas nitrogen.

Identifikasi Pigmen dengan KCKT dan Spektrofotometer UV-Tampak

Pemisahan pigmen dilakukan dengan KCKT fase terbalik yang dilengkapi dengan *diode array detector* menggunakan kolom VP-ODS C18 dengan program gradien elusi campuran antara larutan amonium asetat (1 M), MeOH, dan aseton dengan laju alir 1 mL/menit pada suhu 30°C selama 70 menit. Program gradien elusi dapat dilihat pada Tabel 8. Ekstrak kasar pigmen kering dilarutkan dalam 500 µL aseton, kemudian difiltrasi menggunakan membrane filter (PTFE, 0,2 µm). Sebanyak 20 µL ekstrak pigmen diinjeksikan ke KCKT, sedangkan sebanyak 200 µL ekstrak pigmen diencerkan hingga 5 mL menggunakan labu ukur, kemudian diukur spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Tampak 1700.

Tabel 8. Program elusi gradient dari campuran pelarut metanol (A), aseton (B) dan larutan amonium asetat (1 M) (C) pada pemisahan pigmen dari rumput laut coklat.

No	Waktu (menit)	A (%)	B (%)	C (%)
1	0 - 10	80	10	10
2	10 - 25	80	16	4
3	25 - 70	80	20	0

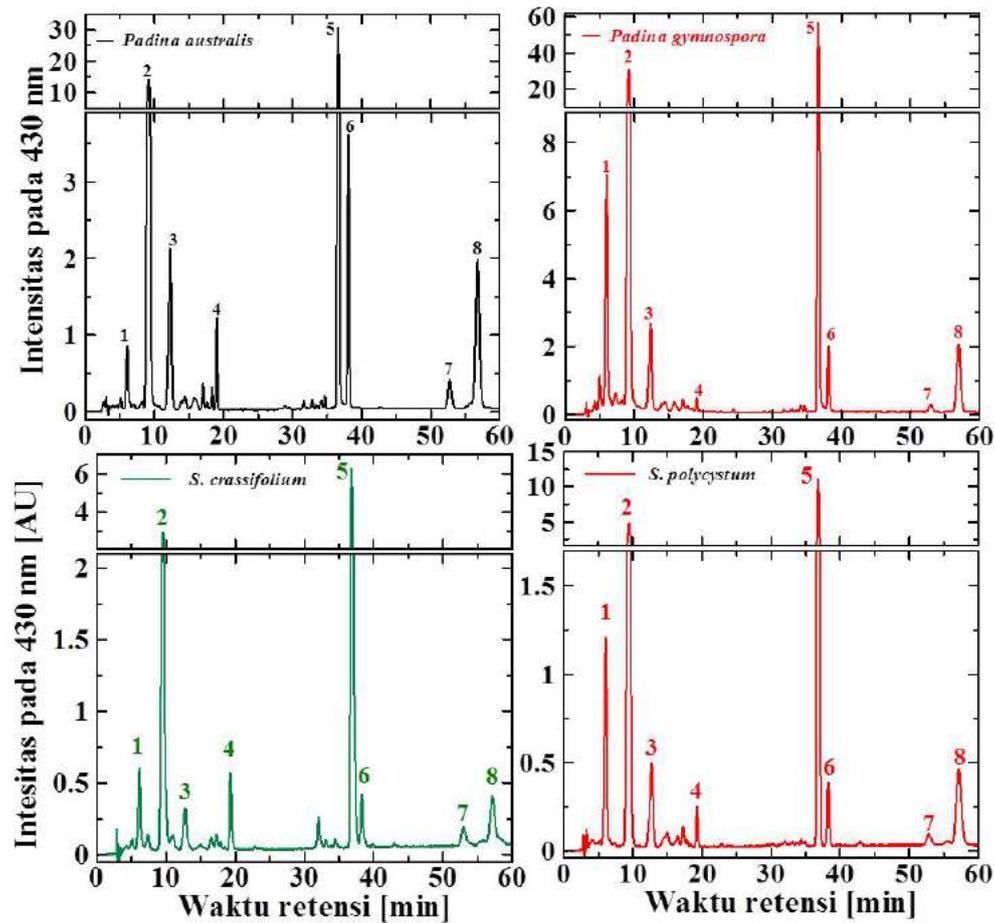
Perhitungan Kandungan Pigmen Dominan

Perhitungan kandungan pigmen dominan yaitu klorofil a dan fukosantin dilakukan dengan persamaan garis kurva standar pigmen antara konsentrasi pigmen dan area puncak hasil KCKT yang terdapat pada Heriyanto dkk (2017). Kandungan klorofil a dan total karotenoid dapat dihitung dari nilai absorbansi spektra serapan ekstrak kasar pigmen yang dimasukkan kedalam persamaan Lichtenthaler (1987).

Hasil dan pembahasan

Spektra serapan *S. crassifolium*, *S. polycystum*, *P. australis* dan *P. gymnospora*, memiliki pola spektra yang realtif sama. Hal ini menunjukkan bahwa 4 jenis rumput laut coklat ini memiliki jenis pigmen yang sama. Nilai absorbansi dari spektra serapan *P. australis* dan *P. gymnospora* hampir sama untuk antar pengulangannya, sedangkan *S. crassifolium*, *S. polycystum* memiliki nilai absorbansi yang berbeda antar ulangannya. Oleh karena itu kedua rumput laut tersebut perlu dilakukan ekstraksi dan pengukuran spektra serapan lagi. Nilai absorbansi memiliki hubungan yang sangat erat dengan kandungan pigmen, dimana nilai absorbansi yang tinggi maka kandungan pigmennya juga tinggi.

Pigmen dari rumput laut coklat dianalisa lebih lanjut menggunakan KCKT. Gambar 58 menunjukkan kromatogram KCKT yang dideteksi pada panjang gelombang 430 nm dari ekstrak pigmen 4 jenis rumput laut coklat. Terdapat 8 puncak utama yang berhasil dipisahkan menggunakan KCKT fase terbalik dengan kolom VP-ODS dan gradien elusi dari campuran pelarut anatar aseton, metanol dan larutan amonium asetat (1 M).



Gambar 58. Kromatogram KCKT yang dideteksi pada 430 nm ekstrak pigmen dari 4 jenis rumput laut, *S. crassifolium*, *S. polycystum*, *P. australis* dan *P. gymnospora*, dalam aseton. Nilai absorbansi dalam 1 g berat kering rumput laut.

Nomor puncak pada kromatogram KCKT dirangkum pada Tabel 8 yang berisi mengenai identifikasi pigmen. Berdasarkan kromatogram KCKT, 4 jenis rumput laut memiliki komposisi pigmen yang tidak berbeda jauh dengan klorofil a dan fukosantin sebagai pigmen dominannya. Komposisi pigmen yang sama ini sesuai dengan hasil dari spektra serapan ekstrak kasar pigmen. Klorofil c merupakan pigmen yang khas dari rumput laut coklat sebagai pigmen pelengkap dari klorofil a, selain itu β -karoten dan karotenoid yang terlibat dalam siklus violaksantin juga diidentifikasi dari rumput laut coklat. Intensitas untuk setiap puncak pigmen berbeda antar jenis rumput laut coklat hal ini menunjukkan bahwa kandungan pigmen yang terkandung di dalamnya juga berbeda-beda.

Tabel 9. Identifikasi pigmen dari 4 jenis rumput laut coklat berdasarkan nilai waktu tambat (t_R) dan panjang gelombang serapan maksimum (λ_{maks}) yang dibandingkan dengan pustaka acuan (Heriyanto dkk., 2017)

No. Puncak	t_R [menit]	λ_{maks} [nm] dalam eluen KCKT	Identifikasi
1	6,1	445, 580, 635	Klorofil c
2	9,2 - 9,2	-, 450, -	Fukosantin
3	12,3 - 12,4	416, 439, 469	Violaksantin
4	19,0 - 19,0	-, 450, 476	Zeaksantin
5	36,6 - 36,6	431, 618, 665	Klorofil a

6	38,1 - 38,1	431, -, 665	Klorofil <i>a'</i>
7	52,7 - 52,9	409, 506, -, 610, 655	Feofitin <i>a</i>
8	56,8 - 57,0	-, 450, 478	β -karoten

Kandungan pigmen dalam mg/g berat kering sampel dari klorofil *a* dan total karotenoid yang diukur berdasarkan hasil spektra serapan serta kandungan klorofil *a* dan fukosantin menggunakan persamaan garis kurva standar pigmen murni dengan KCKT disajikan pada Tabel 9. *P. gymnospora* memiliki kandungan klorofil *a* (4,6 mg/g berat kering dengan spektrofotometer UV-Tampak dan 4,8 mg/g berat kering dengan KCKT) maupun fukosantin (2,4 mg/g berat kering dengan KCKT) atau total karotenoid (2,3 mg/g berat kering dengan KCKT) yang paling tinggi jika dibandingkan jenis rumput coklat lainnya. Kandungan fukosantin dan klorofil *a* dari *P. gymnospora* tersebut lebih rendah hampir 2 kalinya jika dibandingkan dengan kandungan kedua pigmen tersebut dalam *Dictyota dentata* (Heriyanto dkk., 2017). Kandungan pigmen dari rumput laut coklat memiliki urutan sebagai berikut: *P. gymnospora* > *P. australis* > *S. polycystum* = *S. crassifolium*.

Tabel 10. Kandungan pigmen (mg/g berat kering sampel) menggunakan spektrofotometer UV-Tampak, yaitu kandungan klorofil *a* dan total karotenoid, dan KCKT yaitu kandungan klorofil *a* dan fukosantin.

	Spektrofotometer UV-Tampak		KCKT	
	Klorofil <i>a</i>	Total karotenoid	Klorofil <i>a</i>	Fukosantin
<i>P. australis</i>	3,0	1,4	2,6	1,1
<i>P. gymnospora</i>	4,6	2,3	4,8	2,4
<i>S. polycystum</i>	1,3	0,5	1,9	0,4
<i>S. crassifolium</i>	1,7	0,8	1,2	0,2

Pustaka

Heriyanto, Juliadiningtyas, A.D., Shioi, Y., Limantara, L., dan Brotosudarmo, T.H.P. 2017. Analysis of Pigment Composition of Brown Seaweeds Collected from Panjang Island, Central Java, Indonesia. *Philippine Journal of Science*, 146: 323-330.

Lichtenthaler H. K. & Wellburn, A. R.. "Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents". *Botanisches Institut der Universitat, Kaiserstraße 12, Postfach 6380. Karlsruhe, Federal Republic of Germany, and Department of Biological Sciences, University of Lancaster, Bailrigg, Lancaster LA1 4YQ. U.K.*

Ekstraksi dan Pemurnian Bixin (dikerjakan dan dilaporkan oleh Lidwina Angelica dan Stefani Rebeca)

Bahan dan metode

Sampel

Bixa orellana diperoleh dari tanaman yang tumbuh di perkarangan Universitas Ma Chung. Buah Bixa orellana yang sudah matang dan kering diambil bijinya, kemudian biji disimpan pada suhu -20°C .

Ekstraksi Bixin

Biji Bixa orellana kering sebanyak 6,5 g ditambah dengan 25 mL aseton, kemudian diekstraksi selama 15 menit dengan pengaduk magnet. Ekstrak bixin dipisahkan dari bijinya dengan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Ekstrak bixin dipekatkan menggunakan rotary evaporator dan dikeringkan dengan gas N_2 . Spektrum serapan ekstrak bixin, sebelum dikeringkan, diukur menggunakan spektrofotometer UV-Tampak pada panjang gelombang 300-600 nm.

Pemurnian Bixin dengan KCKT

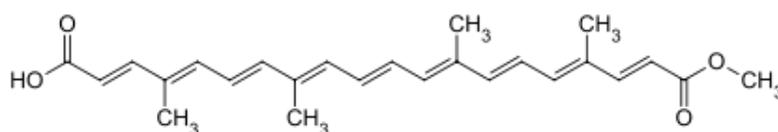
Pemisahan pigmen dari ekstrak bixin dilakukan menggunakan KCKT fase terbalik dengan detektor *diode array* dan kolom C30 (YMC, 150×4.6 mm I.D.). Analisa KCKT dilakukan dengan gradien elusi antara campuran pelarut metanol, MTBE dan air dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Program elusi gradient untuk pemisahan Bixin disajikan pada Tabel 11. Puncak utama dengan waktu tambat 9,5 menit dikoleksi, kemudian dikeringkan menggunakan gas N_2 . Berdasarkan sifat kromatografi dan spektroskopi dan juga hasil dari LCMS fraksi ini diidentifikasi sebagai Bixin. Spektrum serapan Bixin hasil pemurnian menggunakan KCKT diukur dengan spektrofotometer UV-Tampak 1700 (Shimadzu) dalam pelarut etanol dengan interval panjang gelombang 300-600 nm.

Tabel 11. Program elusi gradient dari campuran pelarut metanol (A), MTBE (B) dan air (C) pada pemisahan pigmen Bixin.

No	Waktu (menit)	A (%)	B (%)	C (%)
1	0	81	15	4
2	70	6	90	4

Hasil dan pembahasan

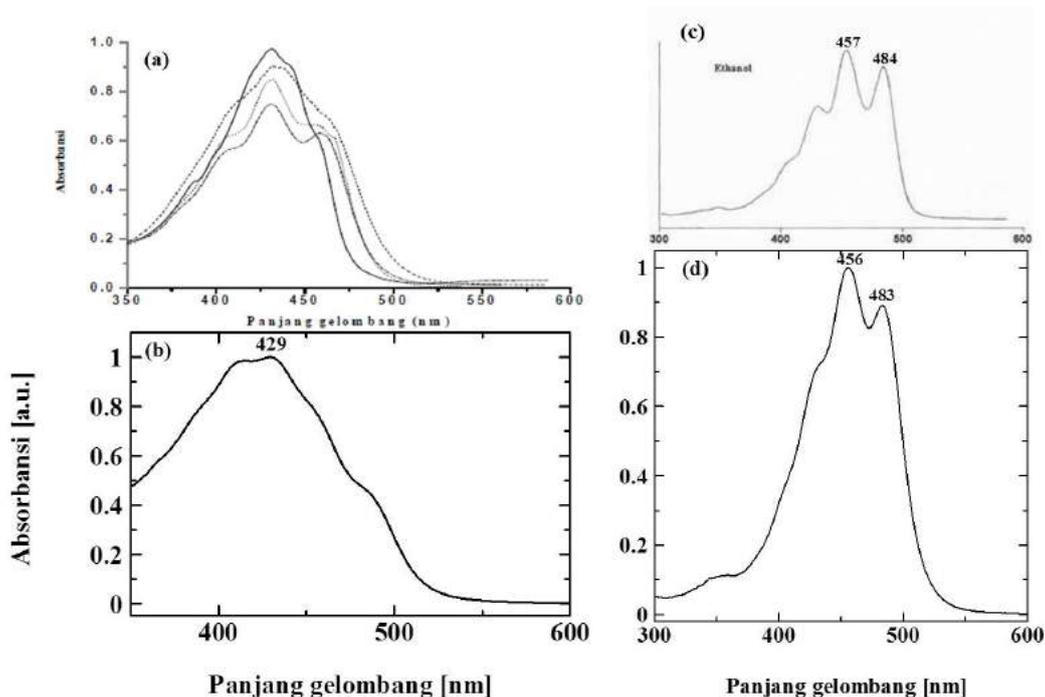
Spektra serapan karotenoid dapat digunakan untuk karakterisasi karotenoid yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Tampak. Karotenoid merupakan pigmen berwarna kuning, oranye sampai merah. Oleh karena itu karotenoid memiliki serapan pada panjang gelombang 350-600 nm dengan 3 puncak pada panjang gelombang serapan maksimumnya. Karotenoid memiliki struktur alifatik atau alisiklik yang umumnya tersusun atas delapan unit isoprena. Gambar 59 merupakan struktur molekul dari bixin yang terdapat ikatan rangkap terkonjugasi (terdapat 9 pada rantai $\text{C}=\text{C}$ utama dan 2 pada $\text{C}=\text{O}$) dengan gugus asam karboksilat dan gugus ester.



Gambar 59. Struktur molekul dari bixin

Bixin dapat diekstrak dari selaput biji Bixa orellana atau Annatto menggunakan pelarut aseton. Spektra serapan ekstrak bixin kasar dalam pelarut aseton disajikan pada Gambar 43 Perbandingan spektra

serapan antara ekstrak bixin kasar dari penelitian dan dari pustaka acuan (Kurniawati dkk., 2007) memiliki bentuk spektra serapan yang berbeda (Gambar 60). Hal ini dikarenakan oleh perbedaan metode ekstraksi yang dilakukan. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bixin diekstraksi dengan aseton dengan diaduk, kemudian ekstrak pigmennya dipisahkan dari residunya dengan filtrasi menggunakan kertas saring. Supernatan hasil ekstraksi tersebut kemudian langsung diukur spektra serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Tampak. Sedangkan pada Kurniawati dkk (2007), terdapat tambahan proses partisi menggunakan petroleum eter (PE). Ekstrak bixin dalam PE kemudian dikeringkan dan dilarutkan kembali dalam pelarut aseton untuk diukur spektrum serapannya. Meskipun terdapat perbedaan bentuk spektra serapan, namun panjang gelombang serapan maksimum (λ_{mak}) ekstrak bixin kasar yang terdapat pada pustaka acuan terdapat pada sekitar 430 nm, sedangkan λ_{mak} pada hasil penelitian ini 429 nm.



Gambar 60. Spektra serapan ekstrak bixin kasar dari pustaka (Kurniawati dkk., 2007) (a) dan hasil penelitian (b) dalam pelarut aseton serta spektra serapan bixin murni dari pustaka (Britton dkk., 2004) (c) dan hasil penelitian (d) dalam pelarut etanol.

Ekstrak bixin kasar dimurnikan menggunakan kromatografi kolom dan dilanjutkan pemurnian menggunakan KCKT. Pemurnian bixin menggunakan KCKT dilakukan dengan kolom C30 dan elusi gradient antara campuran pelarut air, metanol dan MTBE. Spektra serapan bixin murni hasil penelitian ini dan pustaka acuan (Britton dkk., 2004) dalam pelarut etanol disajikan pada Gambar 60c dan Gambar 60d. Bentuk spektra serapan dan λ_{mak} dari spektra serapan bixin murni serupa dengan pustaka acuan. Hal ini menunjukkan bahwa bixin hasil pemurnian menggunakan kromatograf kolom dan KCKT merupakan bixin.

Pustaka

Kurniawati, P.T., Soetjipto, H., dan Limantara, L. 2007. Aktivitas antioksidan dan antibakteri pigmen bixin selaput biji kesumba (*Bixa orellana* L.). *Indonesian Journal of Chemistry*, 7: 88-92.

Britton, G., Laaen-Jensen, S., dan Pfander, H. 2004. *Carotenoids Handbook*. Birkhauser Verlag, Basel.

Ekstraksi, Isolasi, Pemurnian, Identifikasi dan Kurva Standar β -karoten (dikerjakan dan dilaporkan oleh Lidwina Angelica dan Stefani Rebeca)

Bahan dan Metode

Sample.

Sampel pada penelitian ini merupakan beta-karoten (β -karoten) yang sudah melebihi waktu expired date, sehingga dimungkinkan bahwa β -karoten ini sudah terdegradasi dan perlu dimurnikan ulang.

Ekstraksi β -karoten.

Sampel β -karoten (+ 0,1 gr) dimasukkan kedalam eppendorf (kapasitas 2 mL) dan ditambahkan dengan pelarut heksana (1 mL). Sampel diekstraksi menggunakan vortex selama 1 menit dan diletakkan dalam es selama 1 menit. Langkah in diulang sebanyak 3 kali. Ekstrak pigmen dipisahkan dari residu menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Ekstrak β -karoten yang diperoleh ditampung dalam vial dan proses ekstraks dulang sampai 3 kali. Ekstrak β -karoten pada tahap ekstraksi ke-1 dan ke-2 diukur spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Tampak pada panjang gelombang 300-600 nm. Ekstrak β -karoten digabung menjad satu dan dikeringkan dengan gas N₂.

Isolasi β -karoten dengan Kromatografi Kolom.

Ekstrak β -karoten diisolasi menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silica gel dan heksana merupakan fase gerak. Isolasi β -karoten dilakukan dalam pipet Pasteur sebagai kolom kromatografinya dengan ditambah kapas pada ujung pipet agar menahan fase diam yang akan dimasukkan kedalam kolom. β -karoten akan terelusi dengan penambahan heksana 100%. Fraksi β -karoten ditampung dan diukur spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Tampak pada panjang gelombang 300-600 nm terlebih dahulu sebelum dikeringkan dengan gas N₂.

Identifikasi dan Pemurnian β -karoten menggunakan KCKT

Pemisahan pigmen dari β -karoten hasil isolasi dengan kromatografi kolom dilakukan menggunakan KCKT fase terbalik yang dilengkapi dengan detektor diode array. Analisa KCKT dilakukan dengan kolom C30 menggunakan elusi gradient antara pelarut methanol, MTBE dan air dengan perbandingan 81:15:4 (v/v) menjadi 6:90:4 (v/v) selama 70 menit dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Program elusi gradient untuk pemisahan β -karoten disajikan pada Tabel 12.

Berdasarkan sifat kromatografi, yaitu nilai waktu tambat, dan spektroskopi, yaitu bentuk spektra dan panjang gelombang serapan maksimum, puncak all trans isomer β -karoten dan juga turunannya berhasil diidentifikasi. Puncak utama dengan waktu tambat 26,8 menit dikoleksi, kemudian dikeringkan menggunakan gas N₂. Puncak utama pada menit ke-26,8 merupakan all trans isomer β -karoten dicek kemurniannya dengan diinjekkan ke KCKT menggunakan metode yang sama untuk pemisahan pigmen di atas.

Tabel 12. Program elusi gradient dari campuran pelarut metanol (A), MTBE (B) dan air (C) pada pemisahan pigmen β -karoten.

No	Waktu (menit)	A (%)	B (%)	C (%)
1	0	81	15	4
2	70	6	90	4

Identifikasi β -karoten Menggunakan Kromatografi Cair Spektroskopi Massa / Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LCMS)

β -karoten hasil pemurnian dengan KCKT dilarutkan dalam campuran pelarut methanol dan MTBE (4:1, v/v), kemudian dimasukkan ke dalam auto sampler. Analisa β -karoten menggunakan LCMS dilakukan dengan parameter yang tercantum pada tabel 13 dan 14.

Tabel 13. Parameter Umum LCMS

Parameter	Keterangan
Kolom HPLC	Tidak menggunakan kolom
Pelarut	A = 0,1% asam format dalam H ₂ O B = 0,1% asam format dalam MeOH
Kecepatan alir	0,5 mL/menit
Mode elusi	Isokratik, B = 90%
Detektor	PDA pada 450 nm
Sumber cahaya	D ₂ & W
Oven kolom	30 °C
Volume injeksi	10 – 20 μ L
Interfase	ESI
Suhu <i>DL</i>	250 °C
Suhu <i>Heat Block</i>	350 °C
<i>Drying gas flow</i>	15 L/min
<i>Nebulizing gas flow</i>	3 L/min

Tabel 14. Parameter Khusus LCMS

Parameter	Keterangan
Q1 Scan, Q3 Scan, Product Ion Scan, Precursor Ion Scan, Neutral Loss Scan	
<i>Column</i>	Tidak, 0-2 menit
<i>Start</i>	200
<i>End</i>	700
<i>Event time</i>	0,2
SIM	
Waktu	2 menit
<i>Injection volume</i>	20 μ L
Product Ion	
<i>Colission energi</i>	-10 V dan – 35 V

Identifikasi β -karoten dalam Berbagai Pelarut Menggunakan Spektrofotometer UV-Tampak

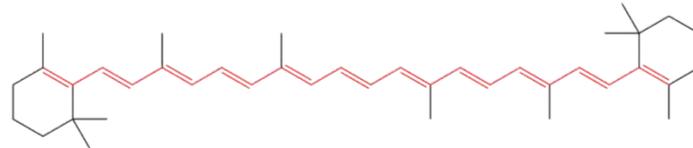
β -karoten hasil pemurnian dengan KCKT dilarutkan dalam beberapa pelarut organik yaitu aseton, etanol, heksana, MTBE, dan toluena. Spektrum serapan β -karoten diukur menggunakan spektrofotometer UV-1700 (Shimadzu) pada interval panjang gelombang 300-700 nm dalam kuvet kuarsa dengan lebar 2 mm.

Pembuatan Persamaan Garis Kurva Standar β -karoten

Kurva standar β -karoten dibuat dari 7 variasi konsentrasi β -karoten dan luas puncak yang dideteksi pada 450 nm dari kromatogram KCKT. Larutan induk β -karoten dalam aseton dihitung konsentrasinya menggunakan hukum Lambert-Beer dengan nilai koefisien ekstingsi 134×10^3 (L \times mol⁻¹ \times cm⁻¹). Larutan β -karoten dibagi kedalam 7 variasi konsentrasi berdasarkan volume larutan induk, 10 μ L, 30 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 500 μ L, 750 μ L, dan 1000 μ L, kemudian larutan β -karoten tersebut masing-masing dikeringkan dengan gas N₂. β -karoten kering dilarutkan dalam aseton (300 μ L) dan diinjeksikan ke KCKT sebanyak 20 μ L.

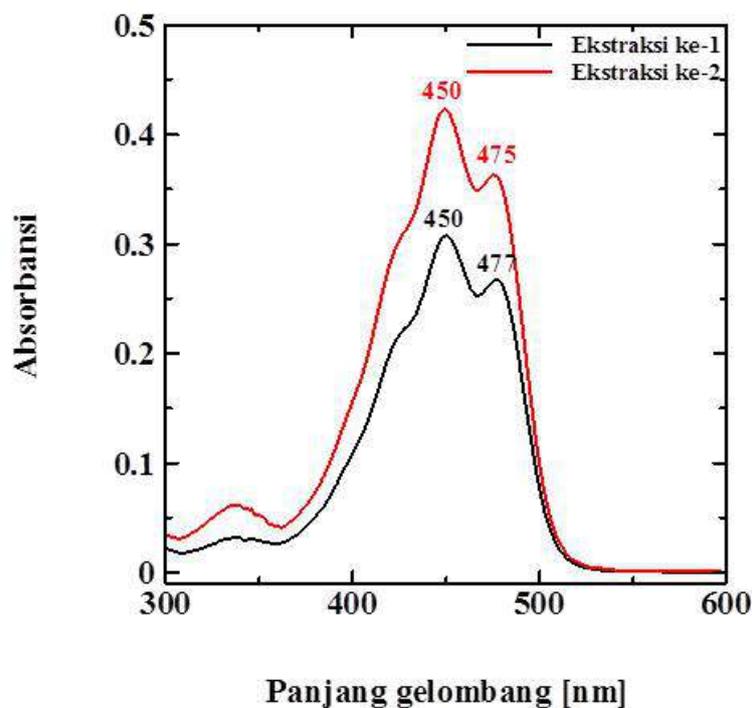
Hasil dan Pembahasan

β -karoten merupakan terpena dengan cincin beta pada kedua ujungnya (Gambar 61). β -karoten memiliki warna kuning sampai kuning jingga dan banyak ditemukan pada ubi jalar, labu kuning, wortel dan lainnya (Astawan dan Andreas, 2008). Rentang panjang gelombang serapan dari β -karoten yaitu pada 350 - 600 nm dengan panjang gelombang serapan maksimum (λ_{mak}) sekitar 450 nm.



Gambar 61. Struktur molekul dari β -karoten

Pada penelitian ini sampel β -karoten diekstraksi, kemudian diisolasi menggunakan kromatografi kolom. Sampel diekstraksi dengan pelarut non-polar, seperti heksana, karena β -karoten merupakan karotenoid non polar golongan karoten dan larut dalam pelarut non-polar. Ekstrak kasar β -karoten yang diperoleh kemudian diukur spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Tampak (Gambar 62).

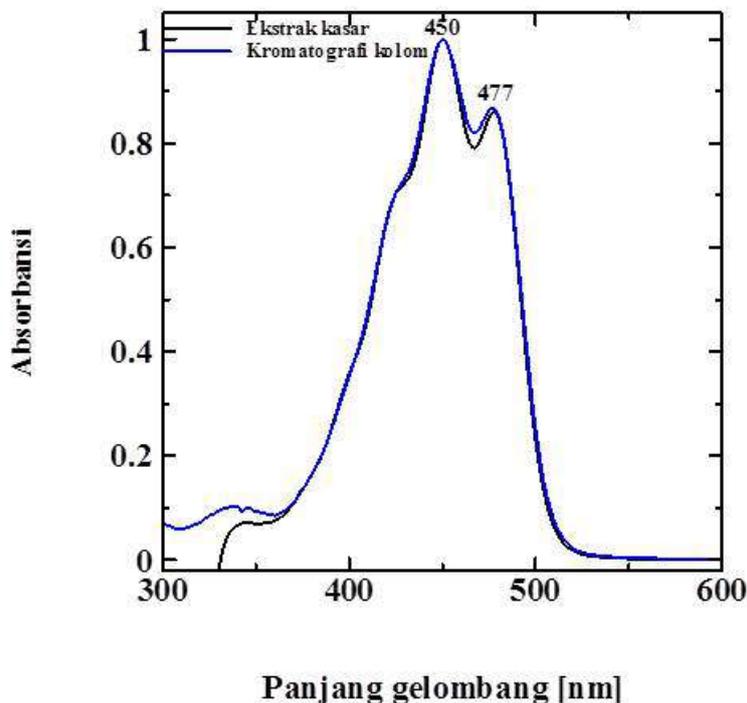


Gambar 62. Spektra serapan ekstrak kasar β -karoten dalam pelarut heksana dari hasil ekstraksi ke-1 (garis hitam) dan hasil ekstraksi ke-2 (garis merah).

Berdasarkan Gambar 62, nilai absorbansi dari spektra serapan ekstrak β -karoten hasil ekstraksi ke-1 lebih rendah jika dibandingkan dengan hasil ekstraksi ke-2, meskipun hasil ekstrak kasar yang diperoleh dari proses ekstraksi dapat dibilang cukup rendah. Oleh karena itu proses ekstraksi dilakukan berkali-kali agar diperoleh nilai absorbansi total yang lebih tinggi. Setelah diperoleh ekstrak kasar β -karoten, kromatografi kolom digunakan untuk mengisolasi β -karoten.

Kromatografi kolom menggunakan 2 fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam fase gerak memiliki sifat kepolaran yang berbeda, sehingga pigmen yang memiliki kepolaran seperti fase gerak akan keluar terlebih dahulu, sedangkan pigmen yang memiliki kepolaran yang relatif sama dengan fase diam akan terikat lebih lama di fase diam dan akan terelusi lebih lama. Fase diam yang digunakan adalah silica gel, sedangkan untuk fase geraknya adalah heksana 100%. β -karoten yang bersifat nonpolar akan mengalami elusi lebih cepat besar karena memiliki tingkat kepolaran yang sama dengan

heksana. β -karoten hasil isolasi dari kromatografi kolom dikoleksi dalam bentuk beberapa fraksi, kemudian digabungkan menjadi satu. Spektra serapan β -karoten sebelum dan setelah isolasi dengan kromatografi kolom dalam pelarut heksana disajikan pada Gambar 63.

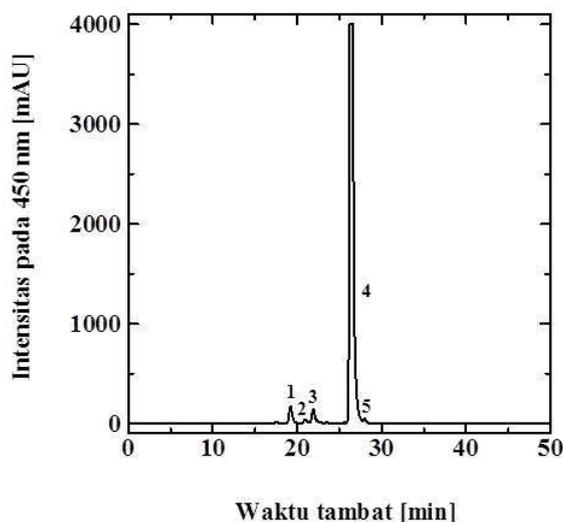


Gambar 63. Spektra serapan β -karoten sebelum (garis hitam) dan setelah kromatografi kolom (garis biru) dalam pelarut heksana.

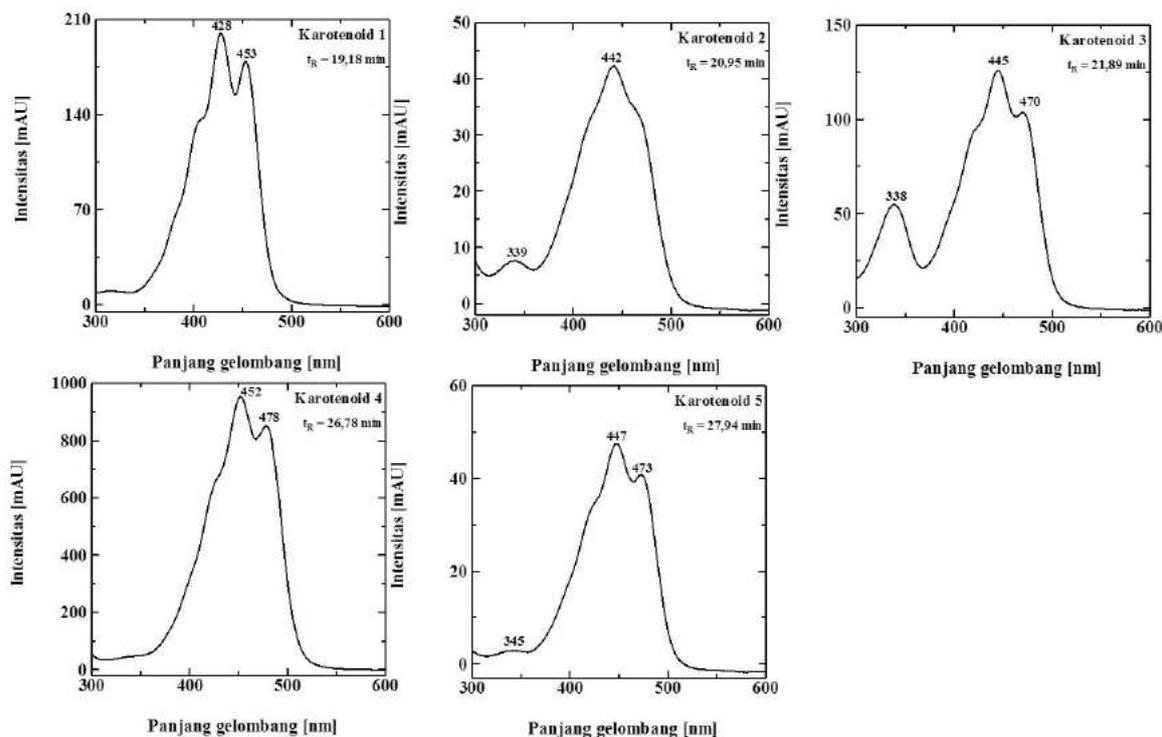
Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa β -karoten dari ekstrak kasar dan β -karoten hasil isolasi dengan kromatografi kolom memiliki sifat spektra serapan, yaitu bentuk spektra dan λ_{mak} , yang sama. Hal ini ditunjukkan λ_{mak} untuk puncak II dan puncak III dari spektra β -karoten pada posisi yang sama, yaitu 450 nm dan 477 nm, secara berturut-turut.

Pemurnian dan Identifikasi dengan KCKT

β -karoten hasil isolasi menggunakan kromatografi kolom kemudian diidentifikasi dan dimurnikan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Hasil pemisahan pigmen dengan KCKT menunjukkan bahwa β -karoten yang sudah diisolasi menggunakan kromatografi kolom tetap saja masih terdapat karotenoid lain yang dimungkinkan merupakan produk degradasi dari β -karoten (Gambar 64).



Gambar 64. Pemisahan pigmen β -karoten dari hasil KCKT menggunakan kolom C30 yang dideteksi pada panjang gelombang 450 nm.



Gambar 65. Spektra serapan karotenoid dalam pelarut KCKT dari 5 puncak yang berhasil dipisahkan dengan KCKT

Terdapat 5 puncak yang berhasil dipisahkan menggunakan KCKT dimana puncak ke-4 merupakan all trans isomer β -karoten, sedangkan 4 puncak lainnya merupakan produk degradasi dari β -karoten, yaitu puncak ke-1 merupakan endoperoksida β -karoten sedangkan puncak ke-2, puncak ke-3 dan puncak ke-5 merupakan isomer *cis* yang dapat diketahui dari keberadaan serapan tambahan sekitar 340 nm (Gambar 65). Identifikasi all trans isomer dan *cis* isomer β -karoten serta turunan β -karoten lain yaitu endoperoksida β -karoten disajikan pada Tabel 13.

Tabel 15. Identifikasi puncak β -karoten dan turunannya hasil pemisahan dengan KCKT menggunakan kolom C30 berdasarkan waktu tambat dan λ_{mak} .

Puncak	Waktu retensi (menit)	λ_{mak} (nm)	Identifikasi
1	19,2	330, -, 428, 453	Endoperoksida β -karoten
2	21,0	339, -, 442, -	Cis-isomer β -karoten
3	21,9	338, -, 445, -	Cis-isomer β -karoten
4	26,8	-, -, 452, 478	All <i>trans</i> isomer β -karoten
5	27,9	345, -, 447, 473	Cis-isomer β -karoten

All trans isomer β -karoten merupakan puncak ke-4 dari β -karoten hasil isolasi dengan kromatografi kolom dan terelusi pada 26,8 menit. Puncak β -karoten dari hasil pemisahan dengan KCKT menunjukkan bahwa pigmen ini memiliki konsentrasi yang sangat tinggi. Hal ini dapat dilihat dari intensitas puncak ke-4 hingga tersaturasi serta ditandai dengan bentuk puncak tidak berupa puncak Gaussian namun seperti puncak yang terpotong. Proses pemurnian β -karoten dilakukan menggunakan KCKT dengan menampung fraksi dari puncak ke-4. Fraksi β -karoten hasil pemurnian dengan KCKT dikeringkan dengan gas N_2 , kemudian diinjeksikan kembali ke KCKT untuk mengetahui presentasi kemurniannya. Pigmen hasil pemurnian dengan KCKT diharapkan memiliki kemurnian atau presentasi area $\geq 95\%$. Tabel 14 merangkum hasil pemisahan pigmen menggunakan KCKT dari sampel β -karoten

hasil isolasi dengan kromatografi kolom. Berdasarkan persentase puncak β -karoten, yaitu puncak ke-23 dan terelusi pada 26,3 menit, memiliki persentase area sebesar 95,1% yang dideteksi pada panjang gelombang 450 nm. Hasil ini menunjukkan bahwa pemurnian β -karotene menggunakan KCKT sudah sesuai dengan standar pemurnian pigmen yaitu memiliki persentase puncak $\geq 95\%$.

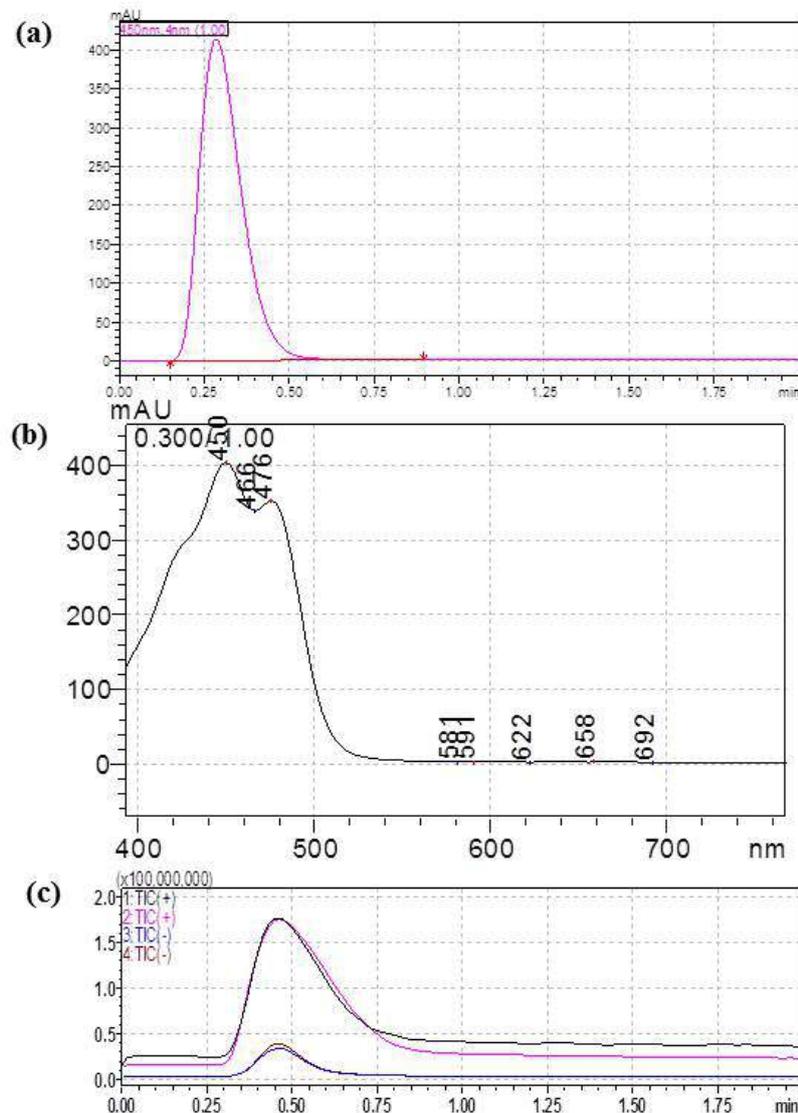
Tabel 16. Data hasil pengujian kemurnian dari β -karoten menggunakan KCKT yang terdiri atas nomor puncak, waktu tambat, area, tinggi dan persentase area dari setiap puncak yang berhasil dipisahkan. Panjang gelombang deteksi pada 450 nm.

No Puncak	Waktu retensi [min]	Area	Tinggi	Prosentase area (%)
1	0,117	1013	30	0,0186
2	0,571	3167	157	0,0581
3	1,298	10628	374	0,1951
4	1,568	3630	782	0,0666
5	1,714	14419	1799	0,2647
6	2,084	53809	10164	0,9877
7	2,181	9362	3378	0,1719
8	2,375	42120	2379	0,7731
9	3,325	1423	107	0,0261
10	8,115	2995	159	0,055
11	8,331	1395	137	0,0256
12	11,591	2842	143	0,0522
13	14,179	1140	77	0,0209
14	15,867	5733	257	0,1052
15	20,854	16176	578	0,2969
16	21,412	9943	529	0,1825
17	21,893	25079	777	0,4603
18	22,523	30251	719	0,5553
19	23,072	1430	289	0,0263
20	23,211	2968	246	0,0545
21	23,477	1080	119	0,0198
22	25,477	13473	574	0,2473
23	26,328	5182640	170802	95,1307
24	33,221	1308	95	0,024
25	35,215	6078	290	0,1116
26	35,733	1292	85	0,0237
27	35,924	1407	117	0,0258
28	37,685	1113	55	0,0204
	Total luas area	5415057		

Identifikasi β -karoten Menggunakan LCMS

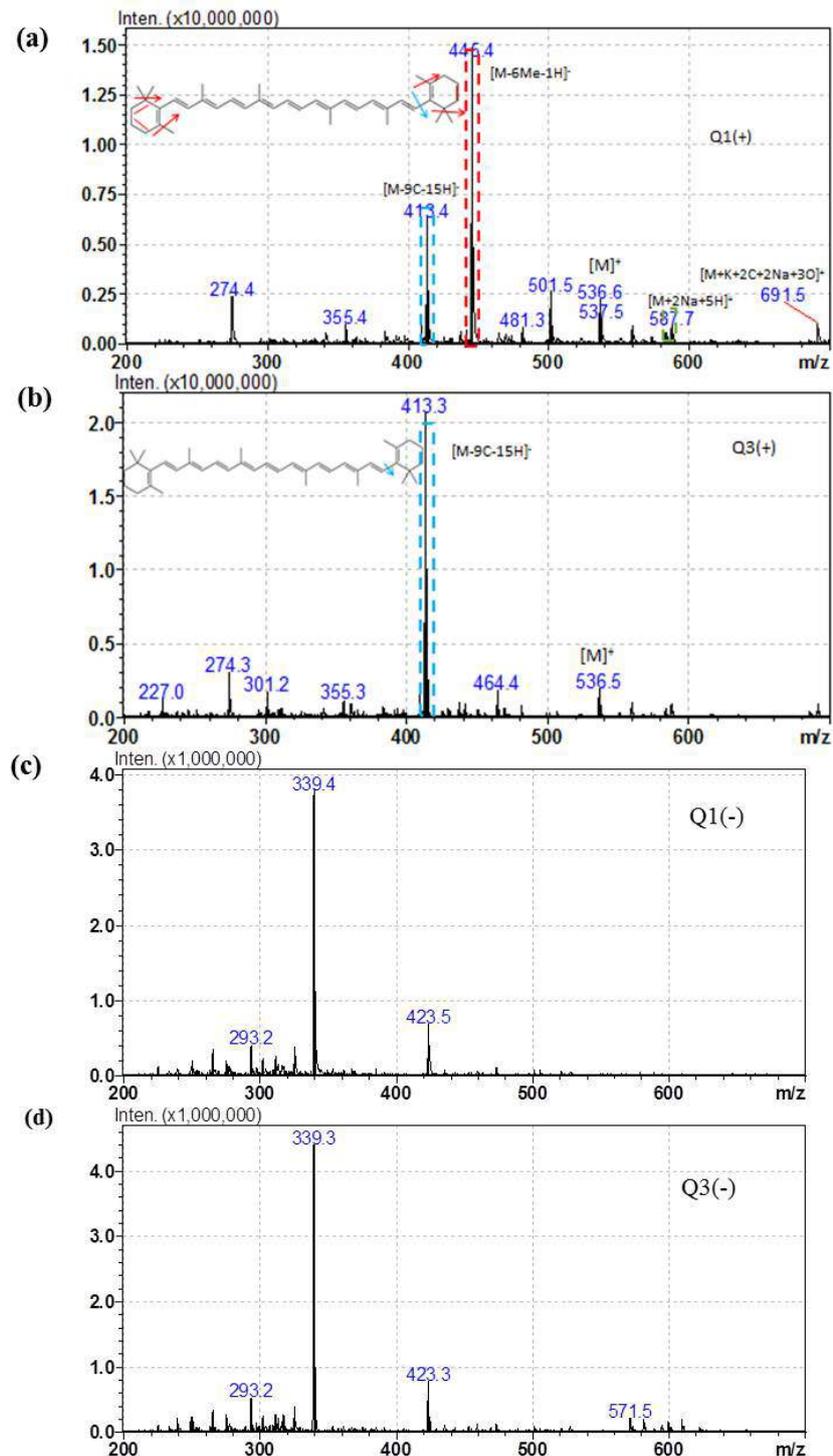
Tahap awal dalam identifikasi pigmen β -karoten menggunakan LCMS adalah dengan melarutkan sampel dalam 1 ml metanol ditambah beberapa tetes (5 tetes) MTBE. Hal ini dikarenakan β -karoten dalam metanol belum dapat larut sempurna sehingga perlu ditambah dengan MTBE yang lebih non polar. Pelarut yang lebih non polar akan lebih efektif melarutkan β -karoten yang juga non polar. Hasil yang didapat dari analisa LCMS adalah ion prekursor dan ion fragmen dari β -karoten serta 3 transisi utama dengan energi tumbukan maksimum berdasarkan hasil mode analisis MRM.

Identifikasi β -karoten awalnya adalah dengan mode Q1 dan Q3 *scan* untuk mengetahui ion prekursor dari molekul β -karoten. Pada hasil scan ini juga dapat dilihat data PDA untuk kromatogram β -karoten yang dideteksi pada panjang gelombang 450 nm dan spektrum serapan serta kromatogram MS seperti yang ditampilkan pada Gambar 66.



Gambar 66. Kromatogram KCKT yang dideteksi pada 450 nm (a), spektrum serapan dalam pelarut KCKT (b) dan kromatogram MS (c) dari β -karoten dengan analisa Q1 dan Q3 scan

Hasil identifikasi β -karoten menggunakan mode Q1 dan Q3 scan menggunakan elusi isokratik antara 0,1% asam format dalam metanol dan 0,1% asam format dalam H_2O (9:1, v/v) menunjukkan munculnya ion prekursor β -karoten m/z 536,4 (Gambar 66). Penggunaan asam format tidak dalam konsentrasi tinggi akan membantu proses isonisasi dan tidak merusak β -karoten. Hasil Q1 dan Q3 *scan* pada β -karoten menunjukkan hasil yang lebih baik dengan ionisasi dengan muatan positif (+). Hasil ini dapat dilihat dari munculnya m/z β -karoten pada Q1(+) dan Q3(+) yaitu sekitar 536, dimana hasil pada Q1(+) scan terdapat pada m/z 536,6 dan pada Q3(+) ditunjukkan pada m/z 536,5. Ion prekursor dari β -karoten ditunjukkan dengan $[M]^+$.

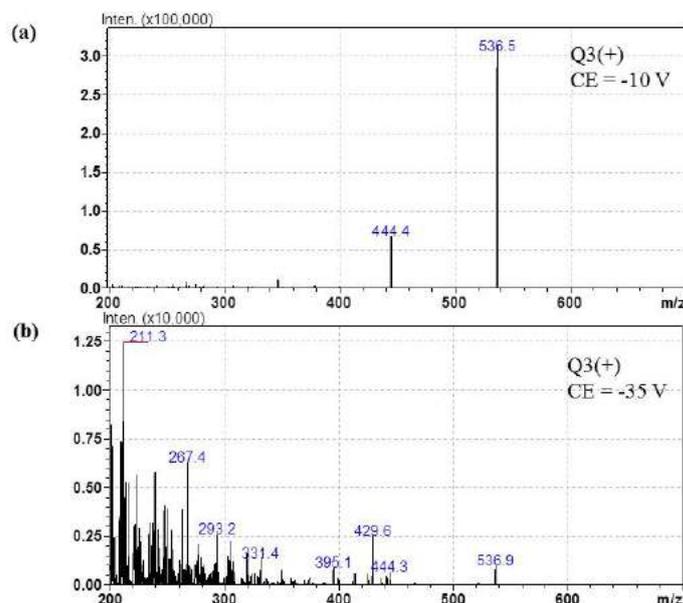


Gambar 67. Spektra MS dari β -karoten berdasarkan hasil Q1 scan (+) (a), Q3 scan (+) (b), Q1 scan (-) (c), dan Q3 scan (-) (d)

Beberapa puncak yang terdapat pada sisi kanan dan kiri dari ion prekursor β -karoten diidentifikasi seperti pada Gambar 67. Sebagai contoh m/z 413,4 diduga merupakan fragmentasi dari β -karoten, yaitu β -karoten tanpa salah satu cincin beta di ujung molekulnya (kekurangan 9 karbon dan 15 hidrogen) yang ditunjukkan dengan $[M-9C-15H]^+$. Sementara sinyal di sebelah kanan menunjukkan keberadaan adduct ion dimana β -karoten terdapat tambahan beberapa atom yang bisa berasal dari pelarut yang digunakan, misalnya metanol- CH_3OH dan asam format- CH_2O_2 , maupun dari udara atau peralatan *glassware* yang digunakan, misalnya sodium (Na) dan potasium (K). Sinyal pada m/z 587,7 diduga

merupakan β -karoten dengan tambahan 2 atom Na dari peralatan yang digunakan dan 5 atom hidrogen dengan $[M-2Na-5H]^+$.

Analisa *product ion scan* memiliki tujuan untuk mencari produk fragmentasi dari β -karoten ketika diberi *collision energi* (CE) tertentu, misalnya -10 V dan -35 V. *Product ion scan* dari β -karoten dengan nilai CE yang semakin besar maka pola fragmentasinya semakin banyak.

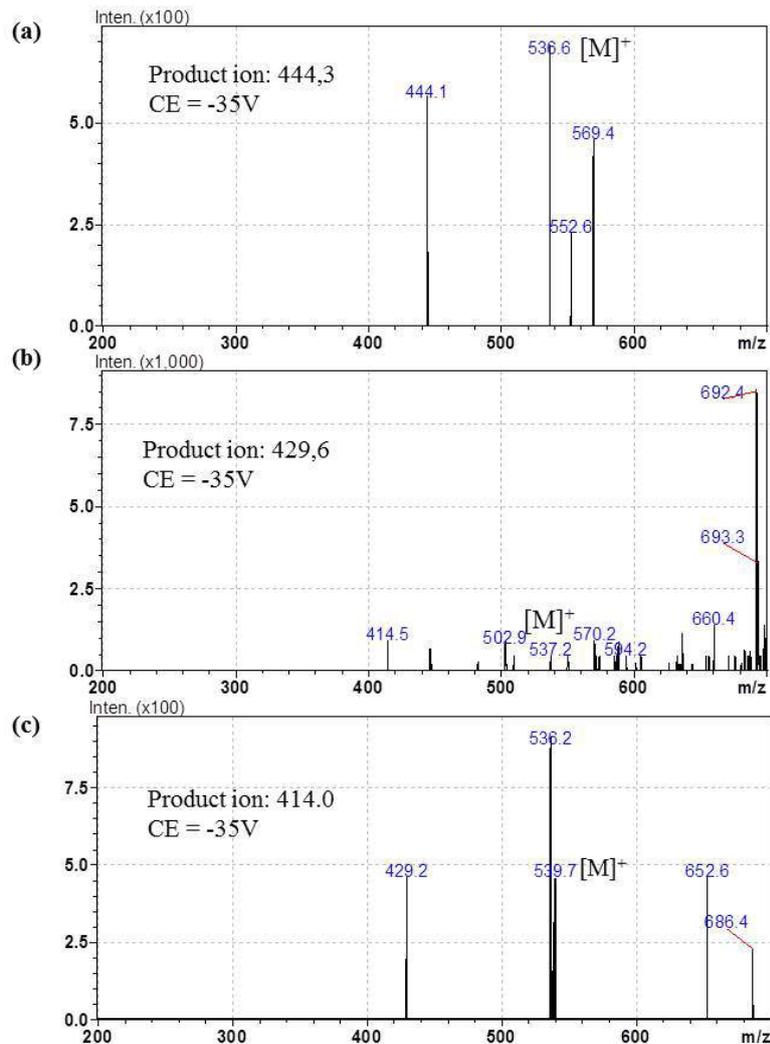


Gambar 68. Spektra MS dari *product ion scan* Q3(+) dari β -karoten dengan CE = -10 V (a) dan CE = -35 V (b)

Hasil dari *product ion scan* dapat dilihat pada Gambar 68 yang menunjukkan bahwa ketika diberi energi -10 V terdapat 1 produk (fragmen) yang ditunjukkan pada m/z 444,4. Sedangkan ketika β -karoten diberi energi sebesar -35 V maka terdapat lebih banyak fragmen yang terbentuk, seperti pada m/z 429,6; 444,3; dan 414,0.

Setelah analisa LCMS dengan mode *product ion scan*, analisa selanjutnya adalah *precursor ion scan* dan *neutral loss scan* untuk membuktikan bahwa ion fragmen dan ion prekursor terdeteksi berasal dari β -karoten.

Analisa *precursor ion scan* memiliki tujuan untuk memastikan atau membuktikan kembali bahwa ion produk yang terbentuk pada *product ion scan* benar adalah hasil fragmentasi dari β -karoten. Caranya dengan memasukkan kembali angka ion produk yang didapat dengan nilai CE tertentu, kemudian apabila di hasil analisa MS terdapat $[M]^+$ dari β -karoten maka ion produk tersebut benar merupakan produk β -karoten. Hal ini dapat dilihat pada hasil di bawah di mana terdapat massa molar β -karoten yang ditandai dengan simbol $[M]^+$ (Gambar 69).

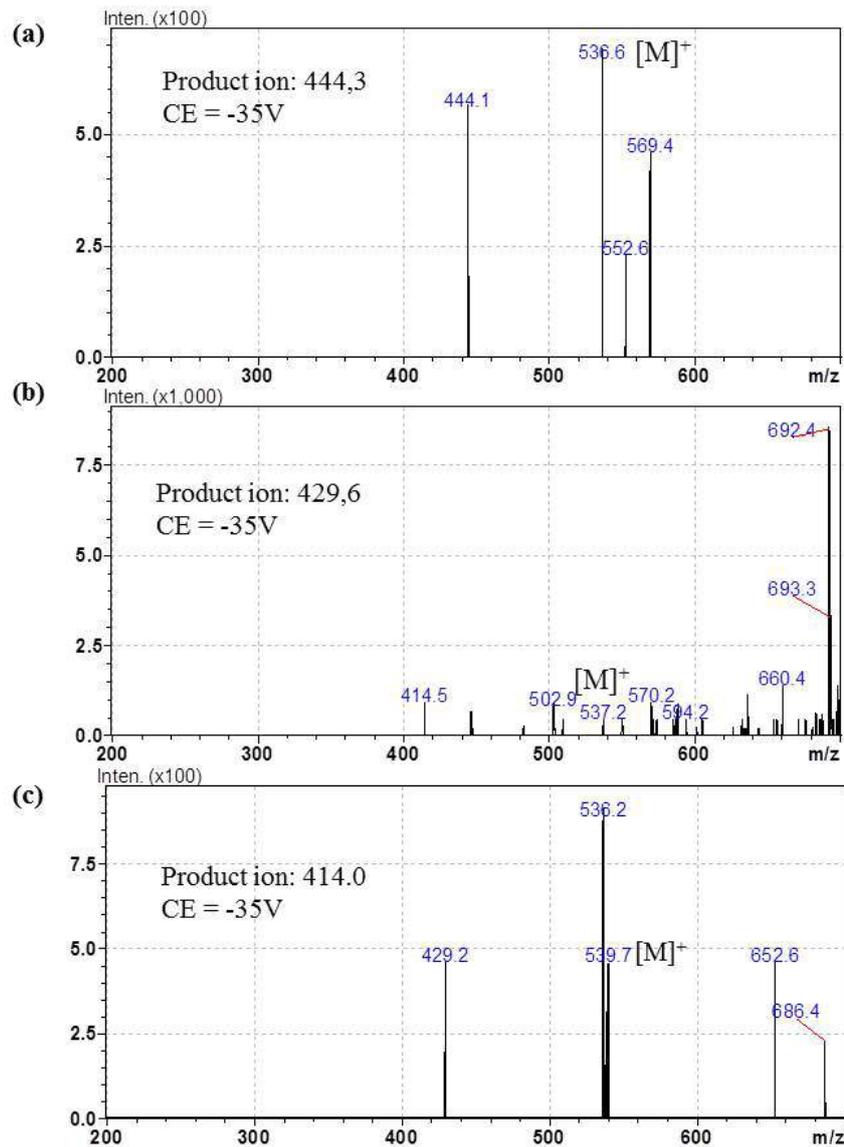


Gambar 69. Spektra MS dari *product ion scan* Q3(+) dari β -karoten dengan CE = -10 V (a) dan CE = -35 V (b)

Hasil dari *product ion scan* dapat dilihat pada Gambar 8 yang menunjukkan bahwa ketika diberi energi -10 V terdapat 1 produk (fragmen) yang ditunjukkan pada m/z 444,4. Sedangkan ketika β -karoten diberi energi sebesar -35 V maka terdapat lebih banyak fragmen yang terbentuk, seperti pada m/z 429,6; 444,3; dan 414,0.

Setelah analisa LCMS dengan mode *product ion scan*, analisa selanjutnya adalah *precursor ion scan* dan *neutral loss scan* untuk membuktikan bahwa ion fragmen dan ion prekursor terdeteksi berasal dari β -karoten.

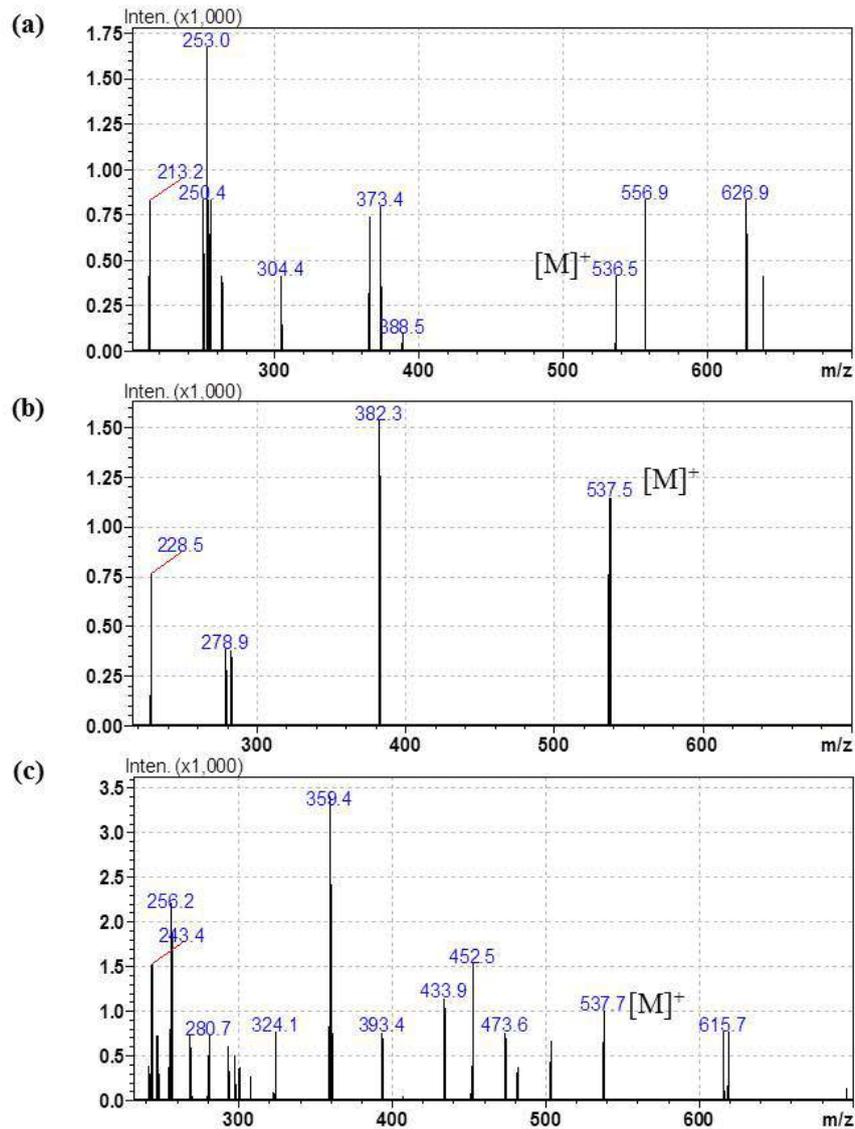
Analisa *precursor ion scan* memiliki tujuan untuk memastikan atau membuktikan kembali bahwa ion produk yang terbentuk pada *product ion scan* benar adalah hasil fragmentasi dari β -karoten. Caranya dengan memasukkan kembali angka ion produk yang didapat dengan nilai CE tertentu, kemudian apabila di hasil analisa MS terdapat [M]⁺ dari β -karoten maka ion produk tersebut benar merupakan produk β -karoten. Hal ini dapat dilihat pada hasil di bawah di mana terdapat massa molar β -karoten yang ditandai dengan simbol [M]⁺ (Gambar 70).



Gambar 70. Spektra MS dari precursor ion scan β -karoten dengan ion produk = 444,3 dan CE = -35 V (a), ion produk = 429,6 dan CE = -35 V (b), dan ion produk = 414,0 dan CE = -35 V (c)

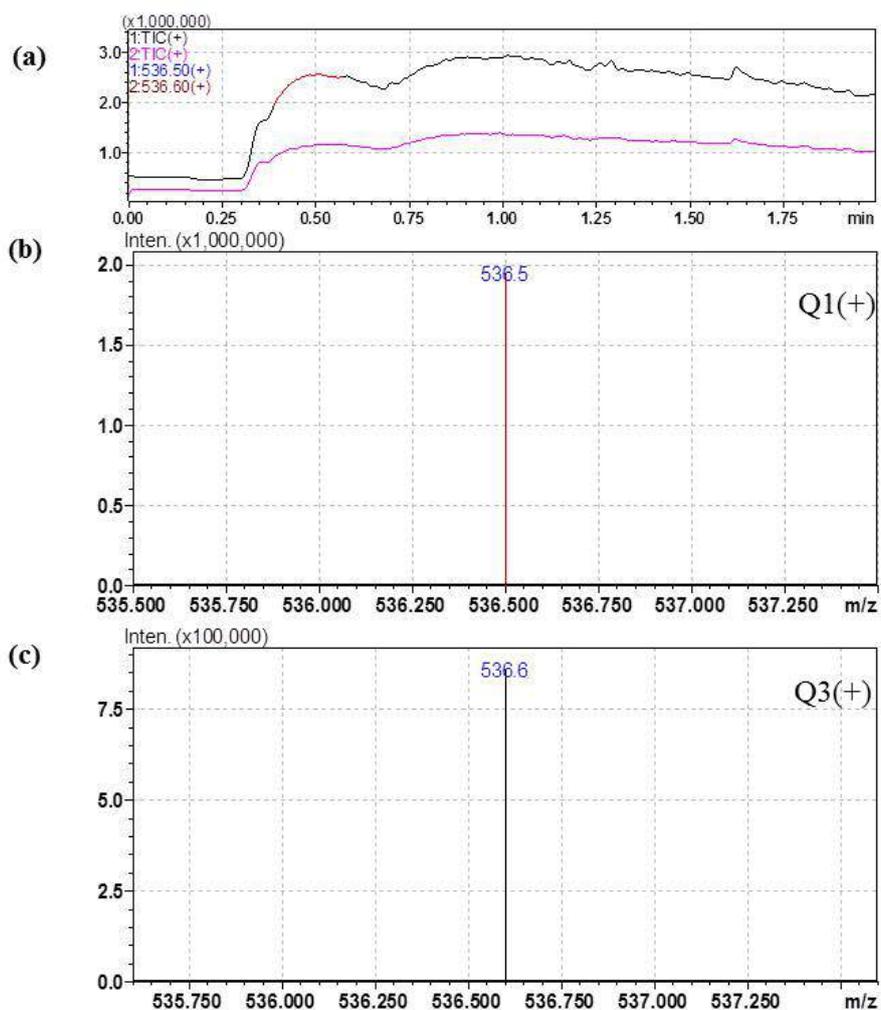
Analisa *neutral loss scan* memiliki fungsi untuk memeriksa fragment yang hilang dari hasil *product ion scan*. Caranya dengan mengurangi m/z ion prekursor dengan ion fragmen (hasil *product ion scan*) dari β -karoten seperti pada perhitungan berikut ini (1) Q3 (+): $536,5 - 444,3 = 92,2$; (2) Q3 (+): $536,5 - 429,5 = 107,0$; (3) Q3 (+): $536,5 - 414,0 = 122,5$.

Hasil analisa dengan *neutral loss scan* untuk 3 fragmen yang hilang diatas disajikan pada Gambar 10. Hasil menunjukkan bahwa 3 fragmen yang hilang merupakan fragmentasi dari β -karoten yang ditandai dengan terdeteksinya m/z 536,5 atau 537,5 atau 537,7 sebagai [M]⁺.



Gambar 71. Spektra MS dari hasil analisa *neutral loss scan* β -karoten dengan nilai fragmen yang hilang m/z 92,2; ion produk = 444,3 dan CE = -35 V (a), nilai fragmen yang hilang m/z 107,0; ion produk = 429,5 dan CE = -35 V (b), nilai fragmen yang hilang m/z 92,2; ion produk = 414,0 dan CE = -35 V (c).

Analisa SIM bertujuan untuk memusatkan pada ion yang dipilih. Misalnya saja dalam hasil ini adalah Q1(+) di 536.5 dan Q3(+) di 536.6. Hasil yang didapat hanya akan menunjukkan 1 spektrum (*peak*) seperti pada hasil di Gambar 72.

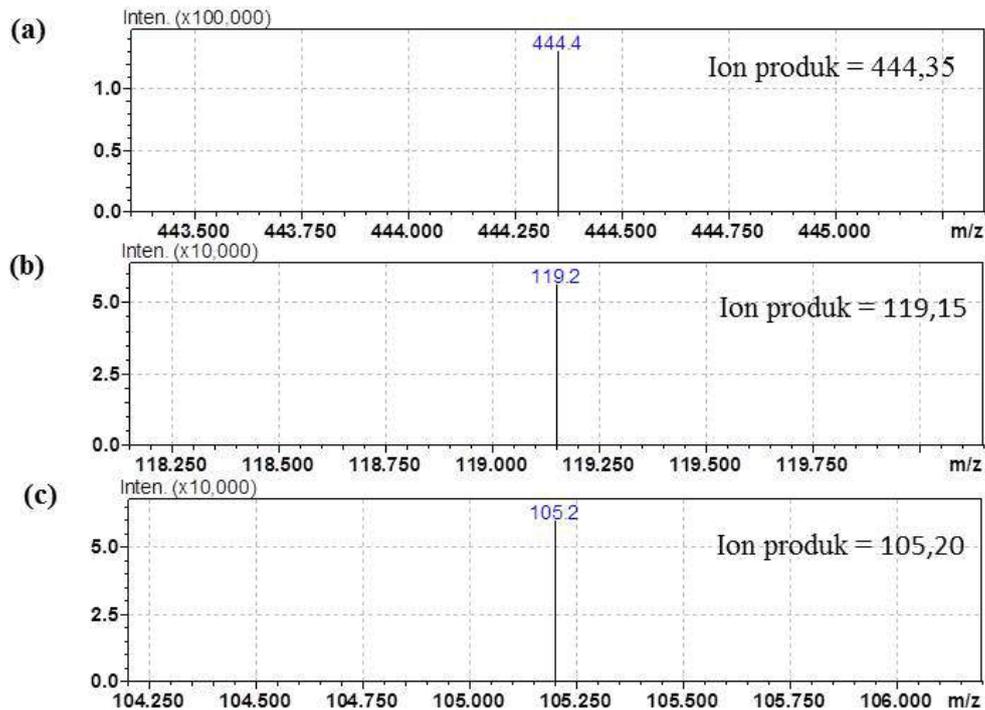


Gambar 72. Kromatogram MS (a) dan spektra MS dari Q1 (+) (b) serta Q3 (+) (c) dari analisa SIM β -karoten

MRM adalah metode yang memiliki kesensitifan dan selektivitas yang tinggi untuk menguji kuantitas dari suatu sampel (protein atau pigmen atau molekul kecil lainnya). Hasil yang ditunjukkan adalah hasil ion produk yang paling dominan. Penggunaan MRM dapat menunjukkan *collision energi* yang tepat (detil) dalam mendapatkan ion produk yang dominan. Sementara bila menggunakan ion prekursor, peneliti yang menginput sendiri ingin menggunakan *collision energi*. Hasil yang ditunjukkan pada MRM ini ion produk yang dominan adalah 444,35; 119,5; dan 105,20 dengan CE berturut-turut -16 V, -40 V, -55 V seperti pada Tabel 17 dan Gambar 12.

Tabel 17. Keterangan Pre Bias dan CE pada hasil MRM dari β -karoten

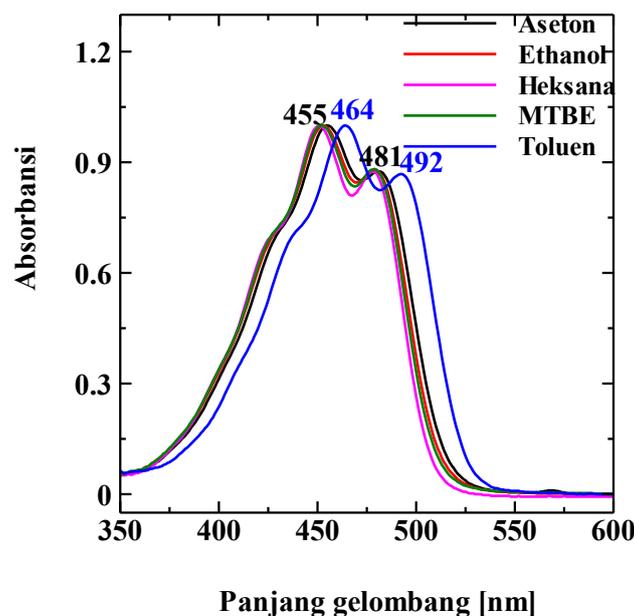
Ion Produk	Q1 Pre Bias	CE (V)	Q3 Pre Bias
444,35	-32,0	-16,0	-23,0
119,15	-32,0	-40,0	-26,0
105,20	-32,0	-55,0	-11,0



Gambar 73. Hasil MRM dari β -karoten pada transis ke-1 m/z 444,35 (a), transis ke-2 m/z 119,15 (b), transis ke-3 m/z 105,20 (c)

Identifikasi β -karoten dalam Berbagai Pelarut Menggunakan Spektrofotometer UV-Tampak

Pada percobaan yang dilakukan akan dilakukan pengujian menggunakan berbagai jenis pelarut yang terdapat di literatur. Tujuan dari pengujian ini untuk mengidentifikasi sampel β -karoten dalam berbagai pelarut dan dibandingkan dengan literatur yang telah dirangkum dalam tabel berikut ini. Pengujian berbagai pelarut ini akan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Berikut ini merupakan hasil spektra β -karoten dari berbagai serapan pelarut, yaitu menggunakan pelarut aseton, etanol, heksana, MTBE, dan toluena.



Gambar 74. Spektra serapan β -karoten dalam berbagai pelarut organik

Tabel 18. Panjang gelombang serapan maksimum (λ_{mak}) untuk puncak II dan puncak III dari β -karoten dalam beberapa pelarut organik dari hasil penelitian ini dan pustaka acuan

Pelarut	Pustaka acuan	Percobaan ini
	II; III	II; III
Aseton	453,5; 479,9	455,0; 481,0
Etanol	449,0; 475,0 450,0; 476,0	453,0; 473,0
Heksana	449,9; 477,7 450,0; 477,0	451,0; 477,0
MTBE	-	452,0; 479,0
Toluena	-	464,0; 492,0

Bila dibandingkan antara literatur (Jeffrey, dkk., 1997 ; Britton, dkk., 2004) dan hasil percobaan (Tabel 18), puncak II dan III pada sampel β -karoten dalam pelarut aseton, etanol, heksana menunjukkan hasil yang hampir sama. β -karoten yang dilarutkan dalam aseton, puncak kedua dan ketiga menunjukkan selisih masing-masing sebesar 1.5 dan 1.1. Sedangkan pada pelarut etanol, hasil percobaan menunjukkan selisih sebesar 3-4 nm pada puncak II dan 2-3 pada puncak III dengan literatur. Heksana sendiri hanya menunjukkan selisih sebesar ± 1 nm antara hasil percobaan dengan literatur. Hal ini menunjukkan bahwa sampel yang digunakan benar adalah β -karoten. Sementara uji pelarut menggunakan MTBE dan Toluena dapat digunakan sebagai acuan pelarut bagi pigmen β -karoten.

Pembuatan Kurva Standar β -karoten

Pembuatan kurva standar diawali dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Tampak untuk mengetahui konsentrasi dari sampel yang akan divariasikan volume pengambilannya. Caranya dengan mengambil sampel sebanyak tiga kali kemudian diukur absorbansinya dan dihitung menggunakan hukum Lambert Beer.

Tabel 19. Pengambilan Data Persiapan Variasi Pelarut untuk Kurva Standar

Ulangan	Absorbansi maksimum	Keterangan
1	0,168	10 kali pengenceran
2	0,174	10 kali pengenceran
3	0,164	10 kali pengenceran

Rata-rata tiga absorbansi yang paling dekat:

$$\frac{0.168 + 0.174 + 0.167}{3} = \frac{0.509}{3} = 0.169$$

10x pengenceran

$$0.169 \times 10 = 1.69$$

Hukum Lambert Beer : mencari konsentrasi (c)

$$A = c \times \epsilon \times l$$

$$1.69 = c \times 134 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 2 \text{ mm}$$

$$1.69 = c \times 134 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 2 \text{ mm}$$

Konversi satuan pada lebar kuvet menjadi cm

$$5 \times 1.69 = c \times 134 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 2 \text{ mm} \times 5$$

$$8.483 = c \times 134 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 10 \text{ mm}$$

$$8.483 = c \times 134 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}$$

$$8.483$$

$$c = \frac{8.483}{134 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}}$$

$$c = 6.33 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$$

Mencari konsentrasi (b/v) (Mr β -karoten = 536.4 gram/mol)

$$c(b/v) = 6.33 \times 10^{-5} \text{ mol/l} \times 536.4 \text{ gram/mol}$$

$$c(b/v) = 0.03395 \text{ gram/l}$$

Konversi satuan menjadi $\mu\text{g/mL}$

$$c(b/v) = 0.03395 \text{ gram/l} \times \frac{10^6 \mu\text{g}}{10^3 \text{ mL}}$$

$$c(b/v) = 33.954 \mu\text{g/mL}$$

Data dan perhitungan di atas adalah absorbansi yang telah didapatkan dari tiga ulangan karena diperlukan data yang memiliki keakuratan yang tinggi. Selanjutnya data pada Tabel 19 akan diolah hingga mendapatkan data konsentrasi dalam satuan $\mu\text{g/mL}$. Dari data diatas akan diolah kembali untuk pembuatan kurva standar. Variasi volume atau konsentrasi β -karoten serta area yang didapat dapat dilihat pada Tabel 20.

Tabel 20. Hasil Perhitungan Pencarian Konsentrasi Variasi untuk Pembuatan Kurva Standar

Variasi Volume (ml)	Konsentrasi (b/v ; $\mu\text{g/ml}$)	Massa Variasi (μg)	Volume Pelarut (μl)	Konsentrasi Variasi ($\mu\text{g/ml}$)	Area	Area/1000
10	33,954	339,54	300	1131,8	174.635	174,635
30	33,954	1018,62	300	3395,4	1.138.711	1.138,711
50	33,954	1697,7	300	5659	2.385.442	2.385,442
100	33,954	3395,4	300	11318	547.285	547,285
500	33,954	16977	300	56590	11.621.913	11.621,913
750	33,954	25465,5	300	84885	17.020.088	17.020,088
1.000	33,954	33954	300	113180	23.958.289	23.958,289

Contoh perhitungan (volume 10 mL) :

Massa variasi (μg)

$$m = \text{konsentrasi (b/v)} \times \text{variasi volume}$$

$$m = 33.954 \times 10$$

$$m = 339.54 \mu\text{g}$$

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)

$$\text{konsentrasi variasi} = \frac{\text{massa variasi}}{\text{volume pelarut}}$$

$$\text{konsentrasi variasi} = \frac{339.54 \mu\text{g}}{\frac{300}{1000} \text{ mL}}$$

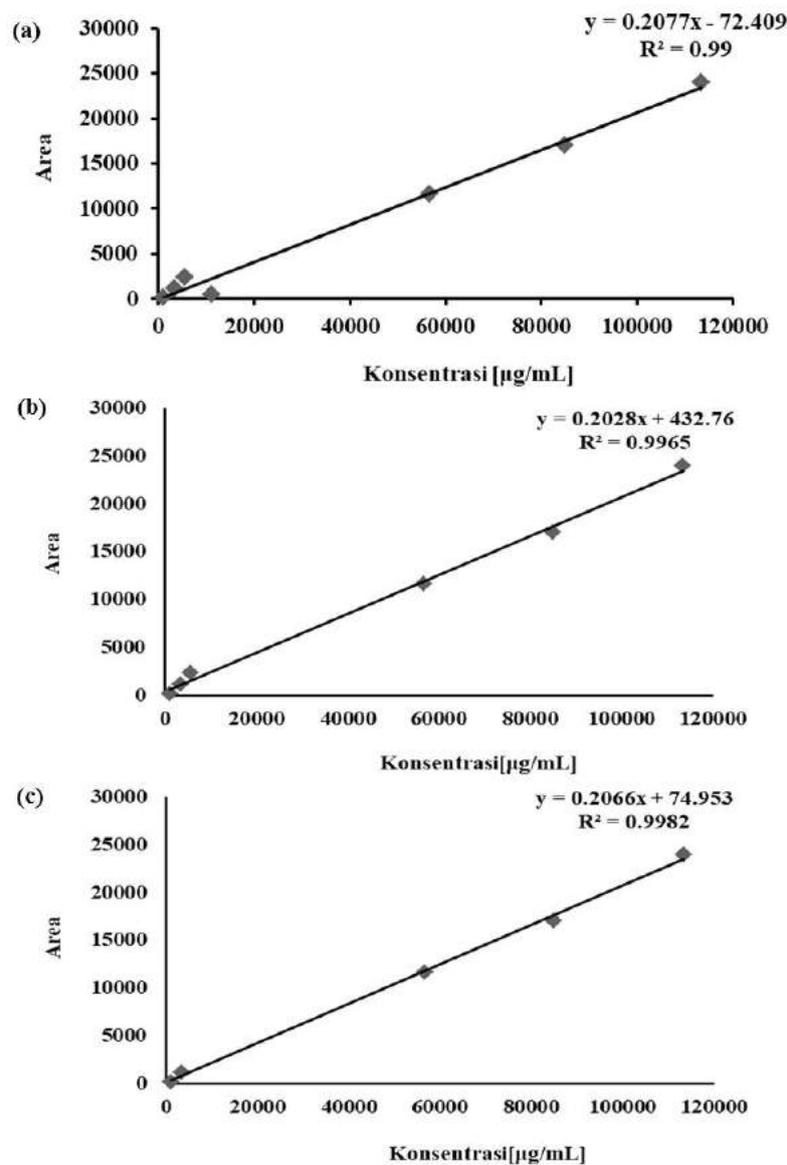
$$\text{konsentrasi variasi} = 1131.8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

Tabel 21. Konsentrasi dan Area sebagai Parameter Pembuatan Kurva Standar

Konsentrasi	Luas area
1.131,8	174,635
3.395,4	1.138,711
5.659	2.385,442
11.318	547,285
56.590	11.621,913
84.885	17.020,088
113.180	23.958,289

Kurva standar merupakan standar dari sampel yang dapat digunakan sebagai acuan untuk sampel tersebut pada percobaan. Pembuatan kurva standar bertujuan mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya sehingga konsentrasi sampel dapat diketahui. Terdapat dua metode untuk membuat kurva standar yaitu metode grafik dan metode least square (Day dan Underwood, 2002) dan pada percobaan ini menggunakan metode grafik.

Cara mendapatkan kurva standar ini dibutuhkan beberapa volume pigmen seperti yang tertera pada Tabel 21 yang kemudian diinjeksikan ke dalam KCKT. Setelah mendapat area dari KCKT, dicari konsentrasi tiap volume tersebut dengan cara dihitung massanya terlebih dahulu. Setelah mendapatkan konsentrasinya, dibuatlah perbandingan antara konsentrasi (sumbu x) dengan area yang didapat dari hasil KCKT (sumbu y) (Gambar 75).



Gambar 75. Kurva standar β -karoten dengan beberapa variasi konsentrasi, yaitu 7 konsentrasi (a), 6 konsentrasi (b) dan 5 konsentrasi (c)

Pembuatan kurva standar menggunakan 5 konsentrasi yang menunjukkan hasil paling bagus. Kurva standar yang diperoleh dalam percobaan ini memiliki persamaan $y = 0.2066x + 74.953$ dengan $R^2=0.9982$. Sementara itu, pembuatan kurva standar menggunakan 7 konsentrasi juga memiliki hasil

yang cukup bagus dengan persamaan garis sebesar $0.2077x - 72.409$ dan $R^2=0.99$. Pembuatan kurva menggunakan 6 konsentrasi lebih baik daripada menggunakan 7 konsentrasi, tetapi tetap lebih bagus kurva standar yang menggunakan 5 konsentrasi yaitu persamaan garis sebesar $0.2028x + 432.76$ dan $R^2=0.9965$. Nilai R^2 menunjukkan tingkat akurasi dan presisi data yang diperoleh sehingga semakin tinggi nilainya akan menunjukkan keakurasian dan presisi yang semakin bagus. Nilai R^2 yang didapat dalam percobaan ini sudah memenuhi persyaratan sebagai kurva standar bagi sampel β -karoten. Semakin banyak jumlah zat terlarut dalam larutan maka akan mengakibatkan konsentrasi dan absorbansinya semakin besar. Hal ini nampak pada tabel di mana seiring dengan semakin banyak pigmen yang terlarut, area yang didapat semakin besar. Kurva standar ini akan menjadi pedoman perhitungan konsentrasi berdasarkan area yang didapat dari KCKT.

Daftar Pustaka

- Astawan, Made., Kasih, Andreas L. (2008). Khasiat warna-warni Makanan. Gramedia. Pustaka Utama, Jakarta
- Day, R. A. and A. L. Underwood. (2002). Analisis Kimia Kuantitatif. Edisi. Keenam. Jakarta. Penerbit Erlangga. Hal 394, 396-404.
- Jeffrey, S. W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. 1997. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. 661p. Paris: Unesco Publishing

Pemisahan Isomer Fukosantin Menggunakan KCKT (dikerjakan dan dilaporkan oleh Arif Agung Wibowo)

Bahan dan Metoda

Sampel. Isomer all-trans fukosantin yang telah diberi perlakuan termal pada suhu 90 °C selama 180 menit. Perlakuan termal ini akan menghasilkan isomer fukosantin dalam bentuk all-trans, 9'-cis, 13-cis, dan 13'-cis.

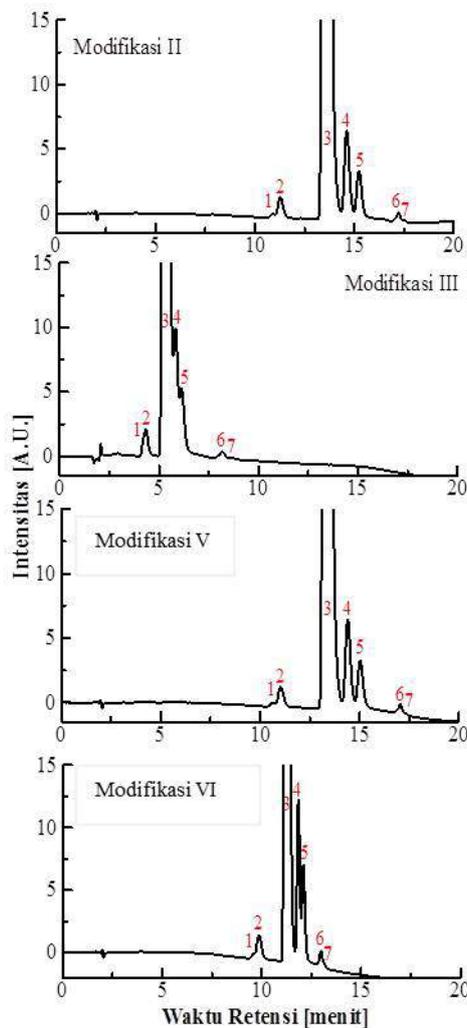
Optimasi pemisahan isomer fukosantin menggunakan KCKT. Isomer fukosantin hasil perlakuan thermal dilarutkan dalam 250 µl asetonitril, kemudian diinjeksikan ke KCKT analitik dengan sample loop 20 µl. Pemisahan isomer fukosantin dilakukan pada kolom C30 (150 × 4,6 mm, I.D. S-3 µm) yang dilengkapi kolom pelindung menggunakan gradien elusi antara campuran pelarut air, metanol, dan MTBE. Suhu kolom dijaga pada 40 °C dengan kecepatan alir pelarut KCKT sebesar 1 ml/min. Variasi metode KCKT dengan program elusi gradien untuk pemisahan isomer fukosantin pada kolom C30 disajikan pada Tabel 22.

Tabel 22. Program elusi gradien pemisahan isomer fukosantin menggunakan kolom C30 dari metode KCKT dengan modifikasi I sampai modifikasi VI

Metode	Waktu (menit)	Prosentase pelarut (%)		
		H ₂ O	MeOH	MTBE
Modifikasi I	0	9	91	0
	10	8,1	81,9	10
	20	4,5	45,5	50
	30	4,5	45,5	50
Modifikasi II	0	12	88	0
	10	8,1	81,9	10
	20	4,5	45,5	50
	30	4,5	45,5	50
Modifikasi III	0	4	96	0
	10	8,1	81,9	10
	20	4,5	45,5	50
	30	4,5	45,5	50
Metode	Waktu (menit)	Prosentase pelarut (%)		
		H ₂ O	Acetonitrile	MTBE
Modifikasi IV	0	9	91	0
	10	8,1	81,9	10
	20	4,5	45,5	50
	30	4,5	45,5	50
Metode	Waktu (menit)	Prosentase pelarut (%)		
		H ₂ O	MeOH	MTBE
Modifikasi V	0	12	88	0
	10	10,8	79,2	10
	20	5,4	39,6	50
	30	5,4	39,6	50
Modifikasi VI	0	12	88	0
	5	10,8	79,2	10
	15	5,4	39,6	50
	30	5,4	39,6	50

Hasil dan Pembahasan

Kromatogram KCKT dari pemisahan isomer fukosantin menggunakan metode KCKT modifikasi II, modifikasi III, modifikasi V dan modifikasi VI yang dideteksi pada 450 nm ditampilkan pada Gambar 76. Hasil pemisahan isomer fukosantin pada Gambar 76 relatif lebih bagus jika dibandingkan dengan hasil analisa KCKT dengan metode modifikasi I dan modifikasi IV.



Gambar 76. Kromatogram KCKT dari pemisahan isomer fukosantin pada kolom C30 menggunakan metode modifikasi II, III, V, dan VI.

Pemisahan isomer fukosantin dengan setiap metode modifikasi dihitung nilai resolusi (R_s), faktor kapasitas (k') dan selektivitas (α) setiap puncak isomer fukosantin. Pemisahan dua puncak yang baik harus memiliki nilai R_s lebih dari 1,5 dengan nilai k' 2-10, sedangkan nilai selektivitas α harus diatas 1. Metode modifikasi II, III, V, dan VI merupakan metode modifikasi yang dapat memisahkan antara puncak 13-cis dan puncak 13'-cis (Gambar 76). Diantara 4 metode modifikasi yang dapat memisahkan 13-cis dan 13'-cis, metode modifikasi II, V, dan VI dapat memisahkan antar isomer fukosantin dengan baik dengan nilai R_s , k' , dan α . Nilai R_s , k' , dan α untuk setiap puncak isomer utama fukosantin dengan variasi metode modifikasi disajikan pada Tabel 23. Tabel 23 juga merangkum hasil identifikasi isomer fukosantin beserta nilai waktu tambat.

Tabel 23. Sifat kromatografi dari pemisahan isomer fukosantin, yaitu resolusi (R_s), faktor kapasitas (k') dan selektivitas (α), serta nilai waktu tambat (t_R) dan identifikasi setiap isomer fukosantin, dengan metode modifikasi II, V, dan VI pada kolom C30 yang dideteksi pada panjang gelombang 450 nm.

No	Modifikasi II				Modifikasi V				Modifikasi VI				Pigmen
	t_R	R_s	k'	α (K2/K1)	t_R	R_s	k'	α (K2/K1)	t_R	R_s	k'	α (K2/K1)	
3	13.5	4.7	7.0	1.1	11.2	3.7	5.5	1.1	9.8	3.7	4.9	1.1	all-trans
4	14.6	2.2	7.6	1.0	11.8	2.2	5.8	1.0	10.7	1.8	5.4	1.1	13-cis
5	15.2	1.2	8.0	1.1	12.1	0.8	6.0	1.1	11.2	1.0	5.8	1.3	13'-cis
6	17.2	4.4	9.2		13.0	2.9	6.5		13.6	2.8	7.2		9-cis

Analisa Fukosantin Menggunakan FTIR (dikerjakan dan dilaporkan oleh Arif Agung Wibowo)

Bahan dan Metoda

Fukosantin murni dalam bentuk isomer all-trans telah dimurnikan menggunakan KCKT dengan kemurnian 98%. Fukosantin hasil pemurnian dengan KCKT dalam kondisi kering dan disimpan pada suhu -30°C sampai digunakan untuk pengukuran FTIR.

Padatan fukosantin murni dicampurkan dengan serbuk KBr yang sebelumnya sudah diaktivasi dengan pengovenan pada suhu 110°C , kemudian dibuat plat KBr. Spektrum FTIR fukosantin diukur menggunakan spektrometer FT-IR (FT/IR-6800 type A, Jasco) dengan parameter pengukuran sebagai berikut: (1) interval spektrum $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, (2) mode pengukuran % transmittance, (3) detektor TGS, (4) resolusi 4 cm^{-1} , (5) jumlah akumulasi scan 64.

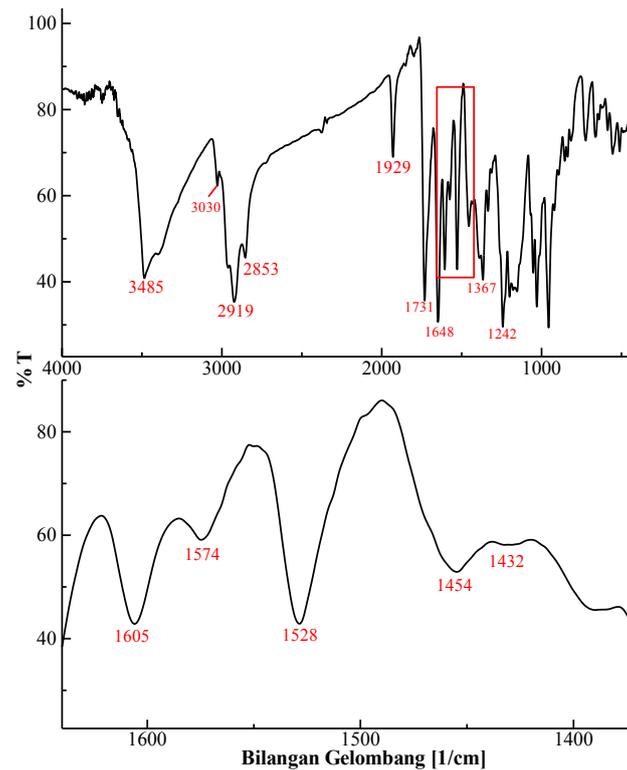
Hasil dan Pembahasan

Struktur molekul fukosantin mengandung beberapa jenis gugus fungsi, diantaranya adalah hidroksi, keton, epoksida, ester dan terdapat ikatan alenik. Spektroskopi IR dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dari suatu molekul. Gambar 77 menunjukkan spektrum FTIR fukosantin dan posisi puncak vibrasi dirangkum pada Tabel 24.

Ikatan alenik yang terdapat pada rantai utama struktur molekul fukosantin dapat terdeteksi pada puncak vibrasi 1929 cm^{-1} . Gugus fungsi lainnya pada fukosantin, yaitu hidroksi dengan ikatan -C-OH dan keton dengan ikatan -C=O dapat teramat pada puncak vibrasi 3485 cm^{-1} dan 1731 cm^{-1} . Hasil analisa fukosantin menggunakan FTIR ini sesuai dengan hasil penelitian Yip dkk. (2014).

Tabel 24. Posisi puncak vibrasi dari spektrum FTIR fukosantin

Bilangan gelombang (cm^{-1})		Gugus Fungsi
Hasil penelitian ini	Yip dkk. (2014)	
3485	3415	-OH
3030	3031	-CH (sp ²)
2919-2853	2964-2921	-CH (sp ³)
1929	1929	Alenik (C=C=C)
1731	1720	Karbonil (C=O)
1648	1646	C=C (alkena)
1605-1432	1607-1429	-CH (sp ³)
1367	1365	-CH (sp ³) vibrasi bengkokan
1242	1258	C-O



Gambar 77. Spektrum FTIR fukosantin dengan interval spektrum 400-4000 cm^{-1} (atas) dan 1200-1700 cm^{-1} (bawah)

Daftar Pustaka

Yip, W. H., Joe, L. S., Mustapha, W. A. W., Maskat, M. Y., & Said, M. 2014. Characterisation and Stability of Pigments Extracted from Sargassum binder Obtained from Semporna, Sabah. *Sains Malaysiana*, 43 (9): 1345-1354.

Lampiran Analisa Pigmen Standar NATChrom

Lampiran ini memuat rangkuman hasil analisa LCMS dari 8 jenis pigmen standar produk NATChrom (<http://natchrom.machung.ac.id>). Kromatogram KCKT, prosentase kemurnian pigmen, spektra serapan dalam pelarut KCKT, spektrum masa dan hasil MRM untuk klorofil *a*, beta-karoten (β -karoten), fukosantin, biksin, likopen, alfa-karoten (α -karoten), lutein dan beta-kriptoksantin (β -kriptoksantin) disajikan secara terpisah beserta informasi mengenai parameter yang digunakan dalam analisa LCMS.

Tabel 25. Rangkuman identifikasi pigmen standar menggunakan LCMS berdasarkan panjang gelombang serapan maksimum (λ_{mak}), *molecular ion species* dan *fragment ions*

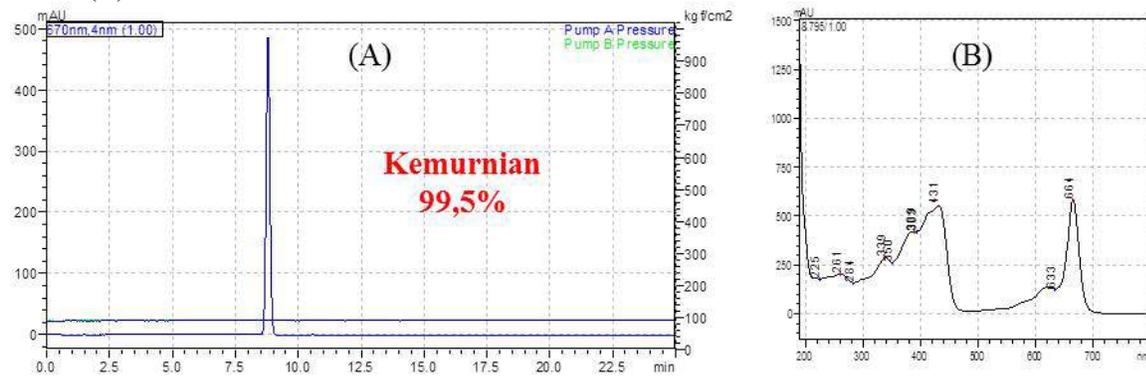
No	λ_{max} [nm] dalam pelarut KCKT	<i>Molecular ion species</i> [m/z]	<i>Fragment ions</i> [m/z]	Identifikasi
1	431,618,665	893,5 [M + H] ⁺	871,6 [M + H - Mg + H ₂] ⁺	Klorofil <i>a</i>
2	-,451,477	536,7 [M] ⁺	-	β -karoten
3	-,450,-	659,6 [M + H] ⁺	641,6 [M + H - H ₂ O] ⁺ ; 581,5 [M + H - OH - C ₂ H ₃ O ₂] ⁺	Fukosantin
4	-,457,484	395,3 [M + H] ⁺	425,5 [M + CH ₃ O] ⁺	Biksin
5	446,472,503	536,5 [M] ⁺	467,3 [M - 2(CH ₃) - C - CH - CH ₂] ⁺	Likopen
6	-,446,474	536,6 [M] ⁺	445,4 [M - 91,2] ⁺ ; 413,4 [M - 123,2] ⁺	α -karoten
7	-,445,473	568,5 [M] ⁺	437,3 [M - 131,2] ⁺ ; 409,2 [M - 159,3] ⁺	Lutein
8	-,451,478	552,6 [M] ⁺	460,3 [M - 92,3] ⁺ ; 445,4 [M - 107,2] ⁺ ; 425,2 [M - 127,4] ⁺	β -kriptoksantin

Pigmen standar : **Klorofil *a***
 Rumus molekul : $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$
 Berat molekul : 893,49

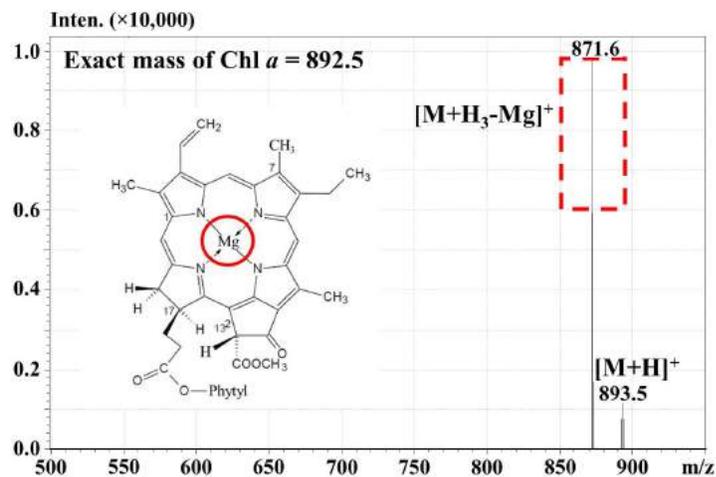
Analisis LC-MS

- Kolom : Cosmosil 5C18-MS-II (4,5x150 mm) (Nacalai Tesque, Japan)
- Pelarut LC : A (0,1% asam format dalam H_2O), B (0,1% asam format dalam MeOH)
- Kecepatan alir : 1 mL/min; sistem elusi = isokratik (B = 90%); detektor = PDA dan MS
- Parameter MS : interfase MS = ESI; mode MS = positif; DL *temperature* = 250 °C; *nebulizing gas flow* = 3 L/min; *heat block temperature* = 400 °C; *drying gas flow* = 15 L/min

Kromatogram KCKT klorofil *a* yang dideteksi pada λ 670 nm (A) dan spektrum serapan-nya dalam pelarut KCKT (B)



Spektrum MS klorofil *a*



Pigmen standar : β -karoten

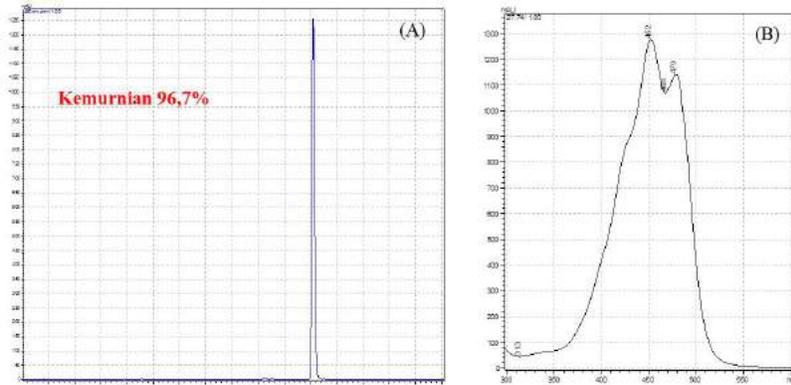
Rumus molekul : $C_{40}H_{56}$

Berat molekul : 536,4

Analisis KCKT

- Kolom : C30 (150 x 4,6 mm ID; YMC)
- Pelarut KCKT : gradient elusi dari campuran pelarut MeOH, MTBE dan H_2O
- Parameter lain : kecepatan alir (1 mL/min); suhu kolom (30°C)

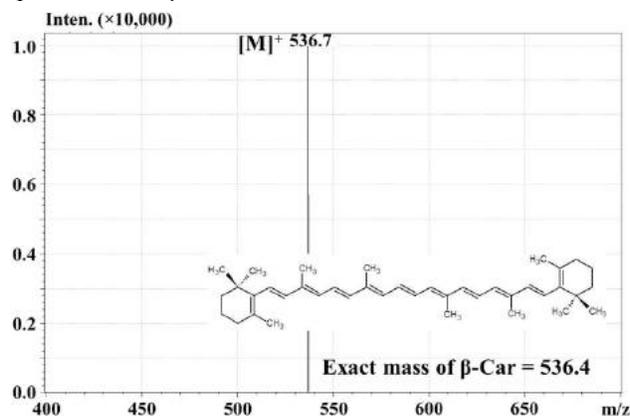
Kromatogram KCKT β -karoten yang dideteksi pada λ 450 nm (A) dan spektrum serapan-nya dalam pelarut KCKT (B)



Analisis LC-MS

- Kolom : Cosmosil 5C18-MS-II (4,5x150 mm) (Nacalai Tesque, Japan)
- Pelarut KCKT : A (0,1% asam format dalam H_2O), B (0,1% asam format dalam MeOH)
- Kecepatan alir : 1 mL/min; sistem elusi = isokratik (B = 90%); detektor = PDA dan MS
- Parameter MS : interfase MS = ESI; mode MS = positif; DL temperature = 250 °C; nebulizing gas flow = 3 L/min; heat block temperature = 400 °C; drying gas flow = 15 L/min

Spektrum MS β -karoten



Pigmen standar : **Fukosantin**

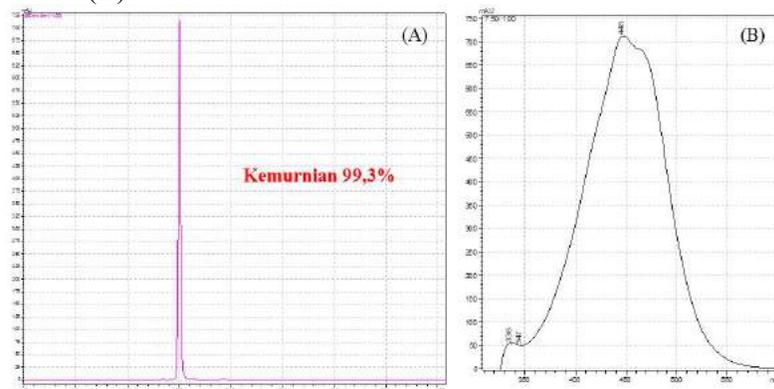
Rumus molekul : $C_{42}H_{58}O_6$

Berat molekul : 658,9

Analisis KCKT

- Kolom : C18 VP-ODS (250 x 4,6 mm ID)
- Pelarut KCKT : gradient elusi dari campuran pelarut MeOH, aseton dan larutan amonium asetat
- Parameter lain : kecepatan alir (1 mL/min); suhu kolom (30°C);

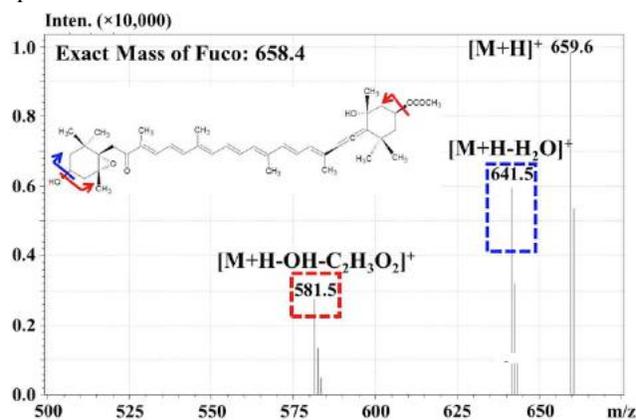
Kromatogram KCKT fukosantin yang dideteksi pada λ 450 nm (A) dan spektrum serapan-nya dalam pelarut KCKT (B)



Analisis LC-MS

- Kolom : Cosmosil 5C18-MS-II (4,5x150 mm) (Nacalai Tesque, Japan)
- Pelarut KCKT : A (0,1% asam format dalam H_2O), B (0,1% asam format dalam MeOH)
- Kecepatan alir : 1 mL/min; sistem elusi = isokratik (B = 90%); detektor = PDA dan MS
- Parameter MS : interfase MS = ESI; mode MS = positif; DL temperature = 250 °C; nebulizing gas flow = 3 L/min; heat block temperature = 400 °C; drying gas flow = 15 L/min

Spektrum MS fukosantin

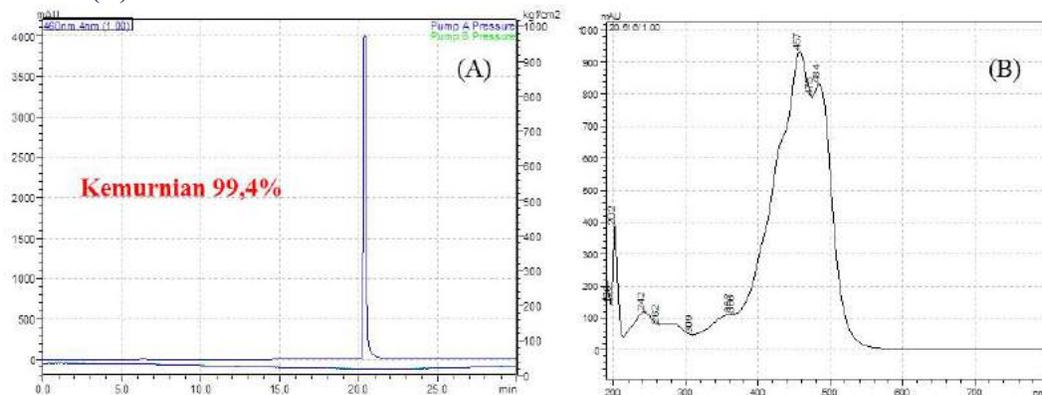


Pigmen standar : **Biksin**
 Rumus molekul : $C_{25}H_{30}O_4$
 Berat molekul : 394,51

Analisis KCKT

- Kolom : C30 (150 x 4,6 mm ID; YMC)
- Pelarut KCKT : gradient elusi dari campuran pelarut MeOH, MTBE dan H₂O
- Parameter lain : kecepatan alir (1 mL/min); suhu kolom (30°C)

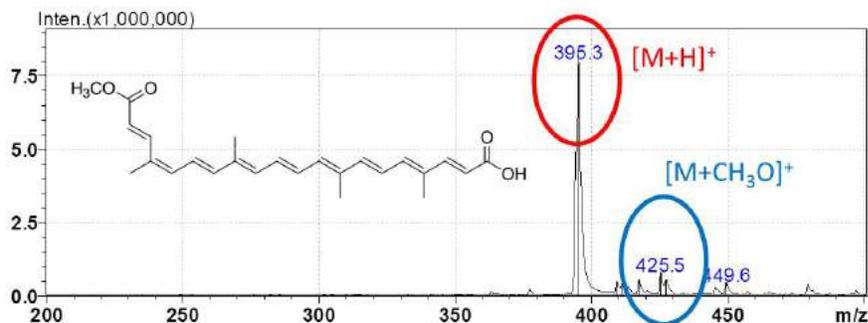
Kromatogram KCKT biksin yang dideteksi pada λ 460 nm (A) dan spektrum serapan-nya dalam pelarut KCKT (B)



Analisis LC-MS

- Kolom : tidak menggunakan kolom
- Pelarut KCKT : A (100% asetonitril), B (0,1% asam format dalam H₂O)
- Kecepatan alir : 1 mL/min; sistem elusi = gradien; detektor = PDA dan MS
- Parameter MS : interfase MS = ESI; mode MS = positif; DL temperature = 250 °C; nebulizing gas flow = 3 L/min; heat block temperature = 400 °C; drying gas flow = 15 L/min

Spektrum MS biksin



Pigmen standar : **Likopen**

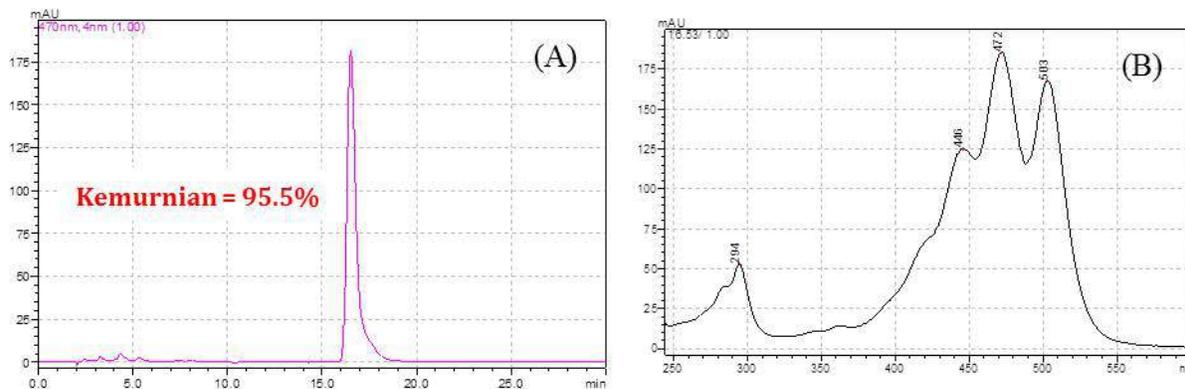
Rumus molekul : $C_{40}H_{56}$

Berat molekul : 536,89

Analisis KCKT

- Kolom : C30 (150 x 4,6 mm ID; YMC)
- Pelarut KCKT : gradient elusi dari campuran pelarut MeOH, MTBE dan H₂O
- Parameter lain : kecepatan alir (1 mL/min); suhu kolom (30°C)

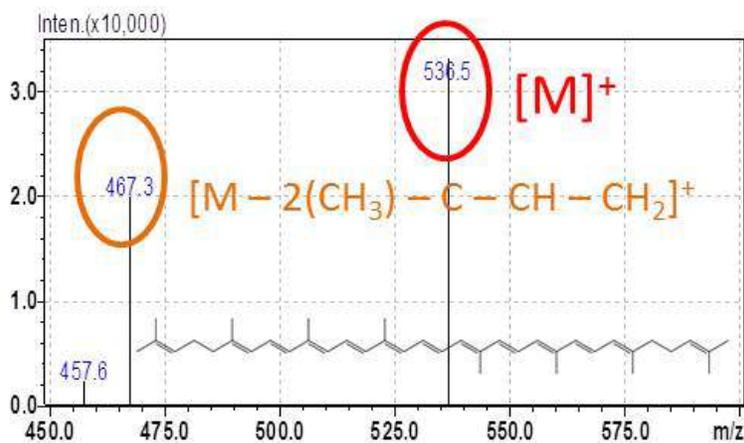
Kromatogram KCKT likopen yang dideteksi pada λ 470 nm (A) dan spektrum serapan-nya dalam pelarut KCKT (B)



Analisis LC-MS

- Kolom : tidak menggunakan kolom
- Pelarut KCKT : A (100% asetonitril), B (0,1% asam format dalam H₂O)
- Kecepatan alir : 1 mL/min; sistem elusi = gradien; detektor = PDA dan MS
- Parameter MS : interfase MS = ESI; mode MS = positif; DL temperature = 250 °C; nebulizing gas flow = 3 L/min; heat block temperature = 400 °C; drying gas flow = 15 L/min

Spektrum MS likopen



Pigmen standar : α -karoten

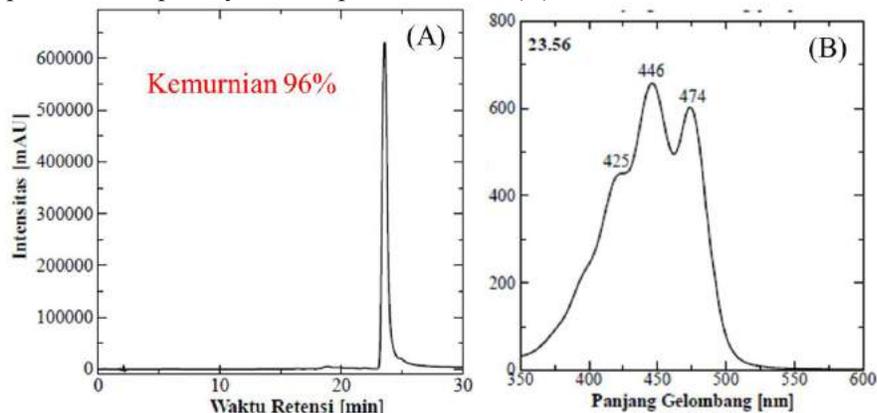
Rumus molekul : $C_{40}H_{56}$

Berat molekul : 536,87

Analisis KCKT

- Kolom : C30 (150 x 4,6 mm ID; YMC) + guard column
- Pelarut KCKT : gradient elusi dari campuran pelarut MeOH, MTBE dan H_2O
- Parameter lain : kecepatan alir (1 mL/min); suhu kolom (30°C)

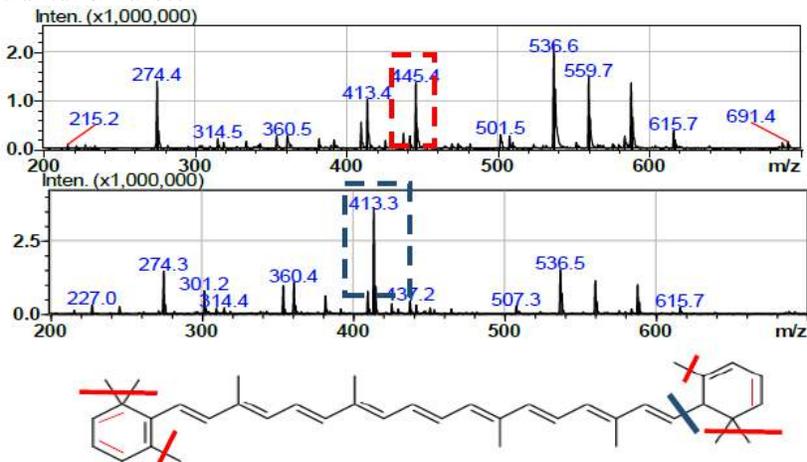
Kromatogram KCKT dari α -karoten yang dideteksi pada 446 nm beserta prosentase kemurniannya (A) dan spektrum serapan-nya dalam pelarut KCKT (B)



Analisis LC-MS

- Kolom : tidak menggunakan kolom
- Pelarut LC : A (0,1% asam format dalam MeOH)
- Kecepatan alir : 0,5 mL/min; sistem elusi = isokratik (A = 100%); detektor = PDA dan MS
- Parameter MS : interfase MS = ESI; mode MS = positif; DL temperature = 250 °C; nebulizing gas flow = 3 L/min; heat block temperature = 350 °C; drying gas flow = 15 L/min

Spektra masa α -karoten dengan mode Q1 (+) dan Q3 (+) scans serta perkiraan pola fragmentasinya dari struktur α -karoten



Hasil MRM dari α -karoten

Precursor ion	Product ion (m/z)	Q1 Pre bias (eV)	CE (eV)	Q3 Pre bias (eV)
---------------	-------------------	------------------	---------	------------------

	444,45	-32	-16	-23
536,5	119,20	-32	-46	-25
	145,20	-32	-40	-16

Pigmen standar : **Lutein**

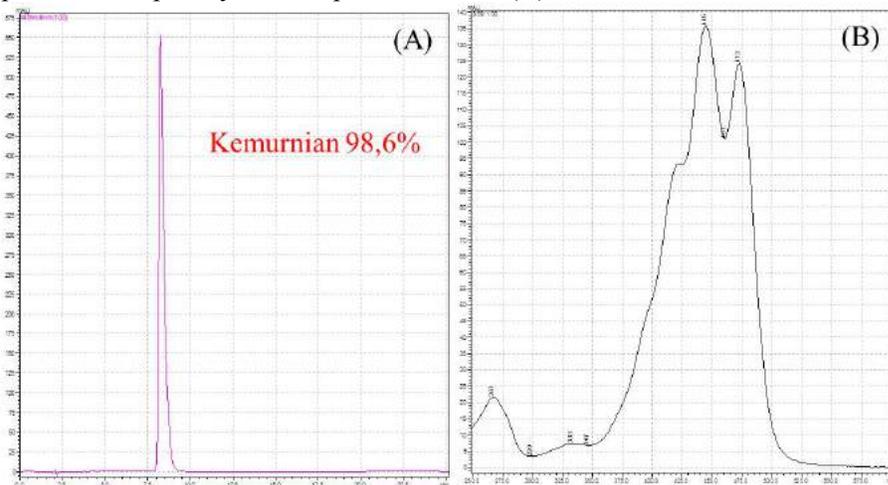
Rumus molekul : $C_{40}H_{56}O_2$

Berat molekul : 568,87

Analisis KCKT

- Kolom : C30 (150 x 4,6 mm ID; YMC) + guard column
- Pelarut KCKT : gradient elusi dari campuran pelarut MeOH, MTBE dan H₂O
- Parameter lain : kecepatan alir (1 mL/min); suhu kolom (30°C)

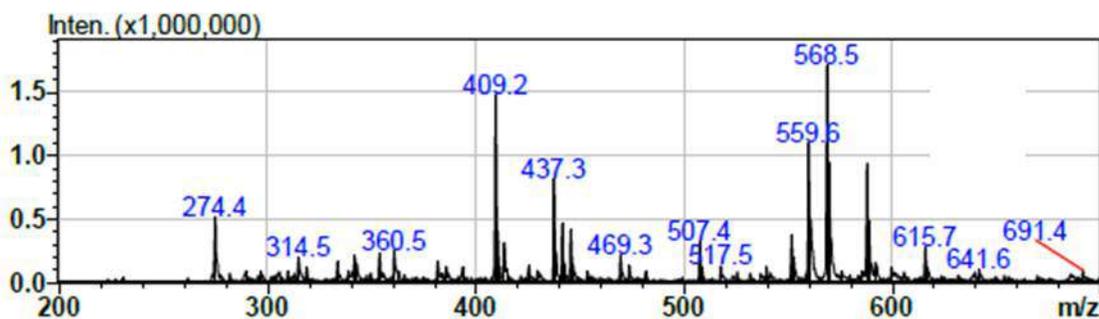
Kromatogram KCKT dari lutein yang dideteksi pada 445 nm beserta prosentase kemurniannya (A) dan spektrum serapan-nya dalam pelarut KCKT (B)



Analisis LC-MS

- Kolom : tidak menggunakan kolom
- Pelarut LC : A (0,1% asam format dalam MeOH)
- Kecepatan alir : 0,5 mL/min; sistem elusi = isokratik (A = 100%); detector = PDA dan MS
- Parameter MS : interfase MS = ESI; mode MS = positif; DL temperature = 250 °C; Nebulizing gas flow = 3 L/min; heat block temperature = 350 °C; drying gas flow = 15 L/min

Spektra masa lutein dengan mode Q1 (+) scan



Hasil MRM dari lutein

Precursor ion	Product ion (m/z)	Q1 Pre bias (ev)	CE (eV)	Q3 Pre bias (eV)
568,5	119,15	-34	-45	-25
	145,1	-34	-34	-10
	133,2	-34	-30	-14

Pigmen standar : β -kriptoksantin

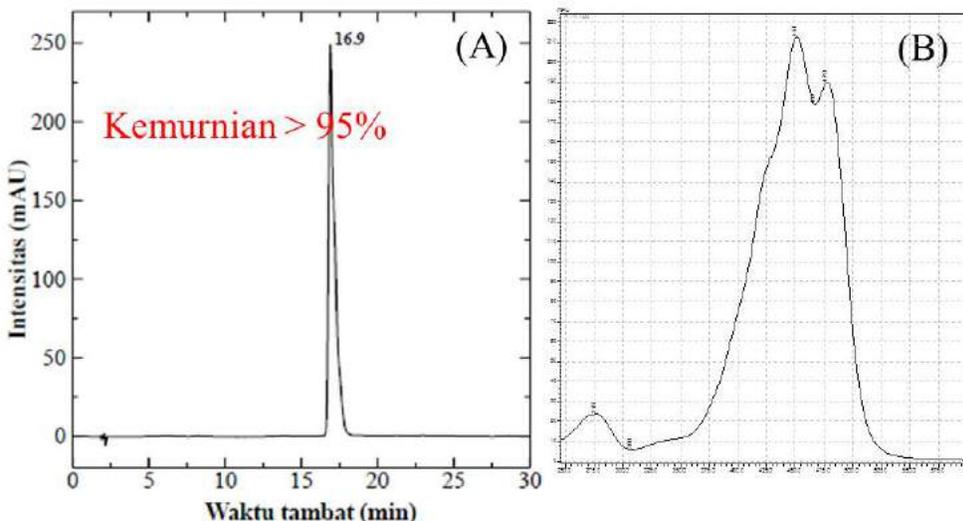
Rumus molekul : $C_{40}H_{56}O$

Berat molekul : 552,85

Analisis KCKT

- Kolom : C30 (150 x 4,6 mm ID; YMC) + guard column
- Pelarut KCKT : gradient elusi dari campuran pelarut MeOH, MTBE dan H_2O
- Parameter lain : kecepatan alir (1 mL/min); suhu kolom (30°C)

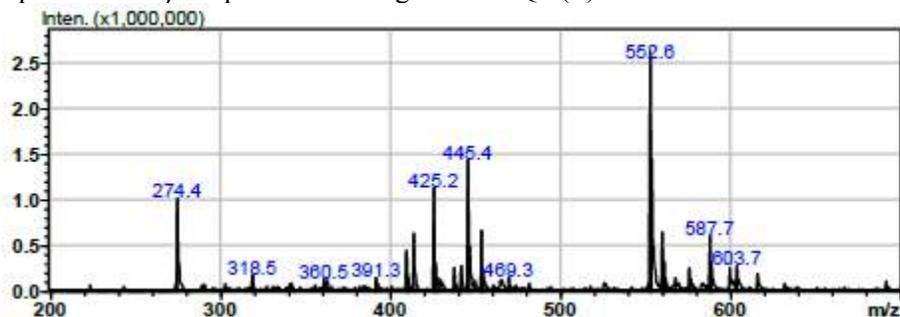
Kromatogram KCKT dari β -kriptoksantin yang dideteksi pada 450 nm beserta prosentase kemurniannya (A) dan spektrum serapan-nya dalam pelarut KCKT (B)



Analisis LC-MS

- Kolom : tidak menggunakan kolom
- Pelarut LC : A (0,1% asam format dalam MeOH)
- Kecepatan alir : 0,5 mL/min; sistem elusi = isokratik (A = 100%); detektor = PDA dan MS
- Parameter MS : interfase MS = ESI; mode MS = positif; DL temperature = 250 °C; nebulizing gas flow = 3 L/min; heat block temperature = 350 °C; drying gas flow = 15 L/min

Spektra masa β -kriptoksantin dengan mode Q1 (+) scan



Hasil MRM dari β -kriptoksantin

Precursor ion	Product ion (m/z)	Q1 Pre bias (ev)	CE (eV)	Q3 Pre bias (eV)
552,6	460,3	-34	-16	-24
	119,15	-34	-35	-24

105,15	-34	-55	-21
--------	-----	-----	-----

Petunjuk Penggunaan Instrumen LCMS-8030 Shimadzu

Menghidupkan dan Mematikan Kondisi Vakum pada LCMS-8030

1. Hidupkan seluruh komponen LCMSMS

Pump : LC-20AD XR (2 buah)

Degasser : DGU-20A3R

Column oven : CTO-20AC

Controller : CBM-20A

Auto sampler : SIL-20AC XR

PDA detector : SPD-M20A

MS : LCMS-8030

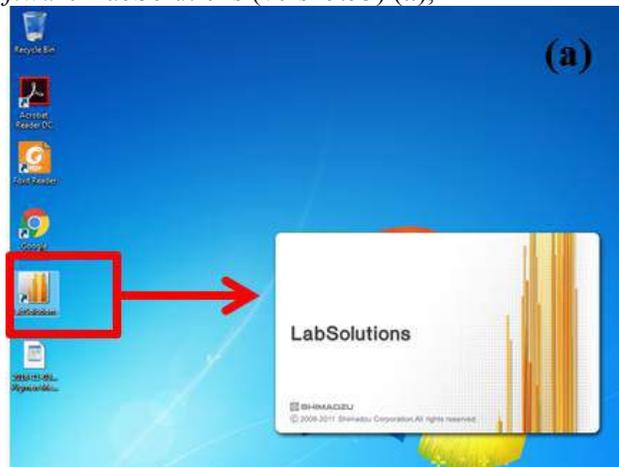
Valve unit : FCV-20AH2

N₂ generator

Buka kran gas Argon

2. Hidupkan PC dan membuka software LabSolution

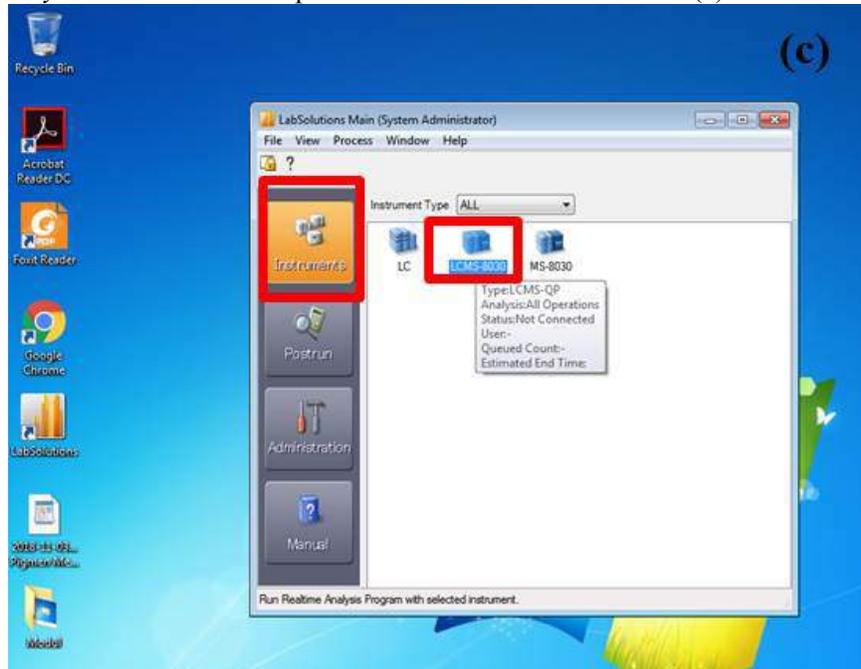
⇒ kemudian buka *software* LabSolutions (versi 5.53) (a),



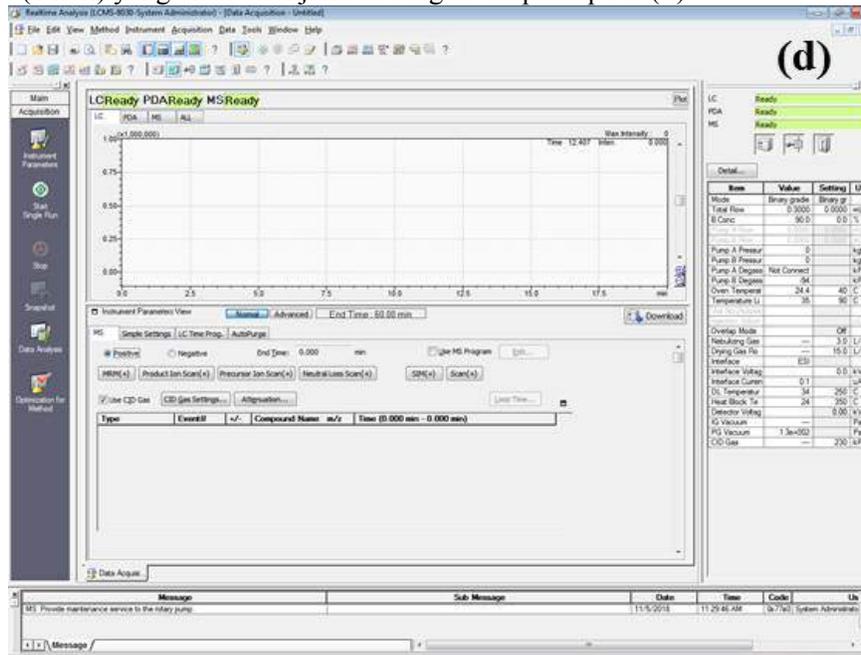
⇒ klik ok (b),



3. masuk ke *system administrator*: pilih *instrument* dan LCMS-8030 (c)



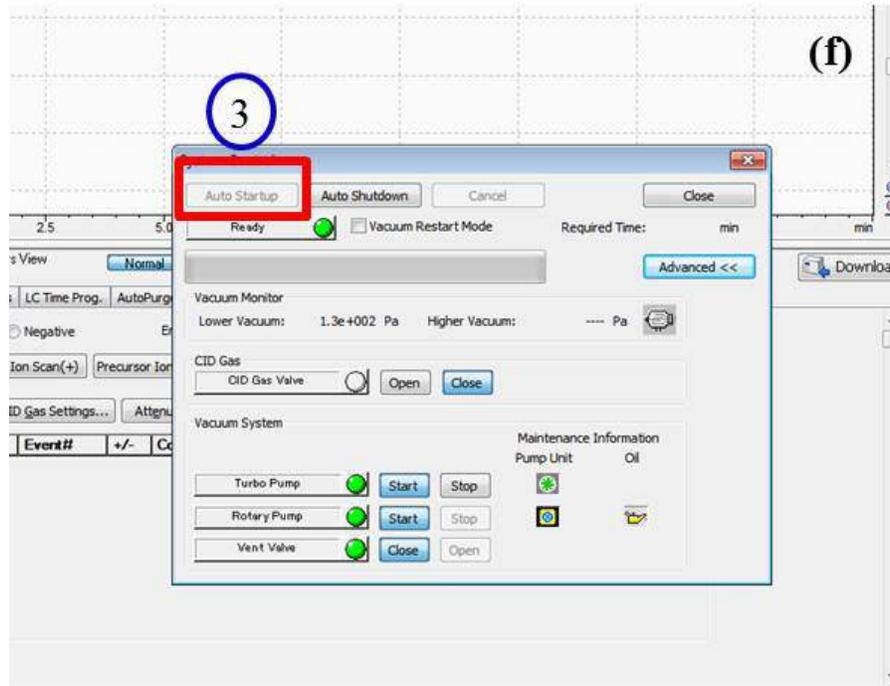
4. jika seluruh komponen LCMS sudah terkoneksi dengan *software* LabSolutions maka akan ada bunyi tit (1 kali) yang akan ditunjukkan dengan tampilan pada (d).



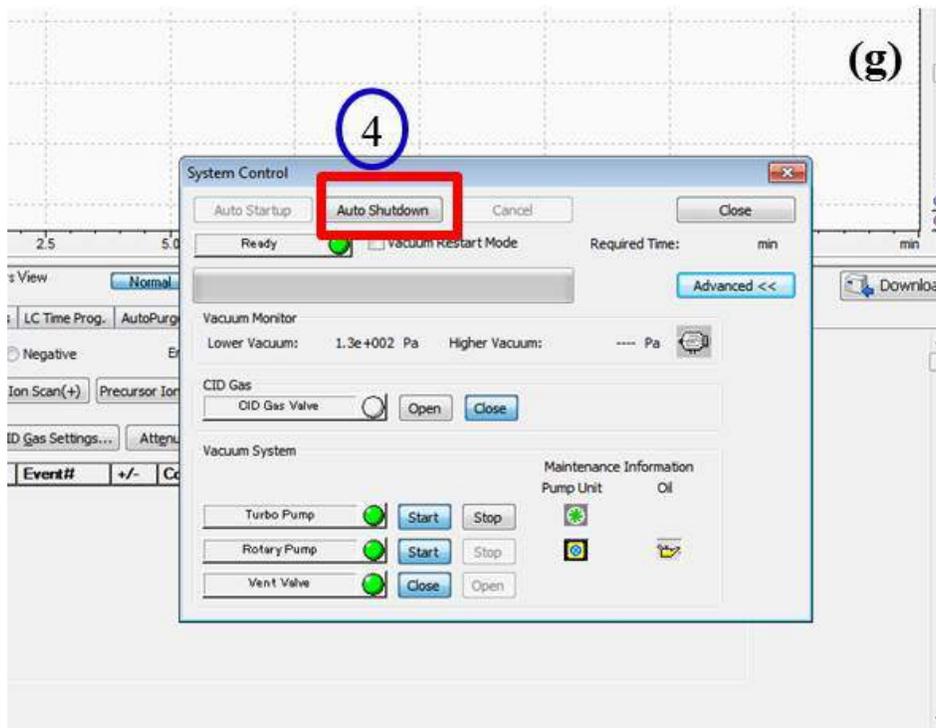
5. System Control LCMS: membuat vakum (auto startup) dan mematikan vakum (auto shutdown)
 ⇒ Pada assistant Bar, buka icon **Main (1)** dan pilih **System Control (2)** (e)



- ⇒ pilih auto startup **(3)** untuk membuat kondisi vakum pada MS. Tunggu sampai auto startup selesai maka tampilan System Control seperti pada (f).
 ⇒ Kondisi vakum pada MS sudah tercapai dan LCMSMS siap digunakan setelah 3 hari kondisi vakum.



- ⇒ Jika LCMSMS tidak digunakan dalam waktu yang lama, maka kondisi vakum pada MS perlu dimatikan, berikut ini adalah langkahnya: ulangi langkah 1 dan 2 di atas, pilih auto shutdown (4), tunggu beberapa saat sampai proses auto shutdown selesai (g). Matikan semua komponen LCMSMS.



Menggunakan Instrumen LCMS-8030 untuk Analisa Pigmen

Tujuan

- ⇒ Untuk mendapatkan *precursor ion* (m/z) dari 4 karotenoid standar menggunakan mode Q1 dan Q3 scan
- ⇒ Untuk mendapatkan *fragment ions* (m/z) dari 4 karotenoid standar menggunakan mode *product ion scan* dengan 2 nilai *collision energy* (C.E.), misalnya (- atau +) 10 V dan 30 V.
- ⇒ Untuk memastikan bahwa *fragment ion* (m/z) yang dihasilkan berasal dari *precursor ion* (m/z) 4 karotenoid standar menggunakan mode (1) *precursor ion scan* dan *neutral loss scan*
- ⇒ Untuk mendapatkan kromatogram MS dari *precursor ion* (m/z) karotenoid standar menggunakan mode *selected ion monitoring* (SIM)
- ⇒ Untuk mendapatkan 3 transisi utama atau *product ion* utama (m/z) dan nilai C.E. dari 4 karotenoid standar menggunakan mode MRM optimization.

Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan adalah pigmen standar: fukosantin, lutein, β -karoten dan β -kriptoksantin. Masing-masing karotenoid standar dilarutkan dengan 1 mL metanol dan dimasukkan ke dalam botol sampel dengan tutup septum. Karotenoid standar tersebut diletakkan ke dalam rak di auto sampler.

Parameter LCMS

Metode LC

Fase gerak A	: 0,1% asam format dalam air
Fase gerak B	: 0,1% asam format dalam MeOH
Kecepatan alir	: 0,3 mL/min
Kolom HPLC	: tanpa kolom
Elusi LC	: isokratik 90% B
Volume injeksi	: 10 μ L
Suhu oven	: 30°C

Kondisi Interfase MS

Interfase MS	: <i>electrospray ionization</i> (ESI)
Suhu <i>Heat Block</i>	: 400°C
Suhu DL	: 250 °C
<i>Nebulizing Gas</i>	: 3 L/min
<i>Drying Gas</i>	: 15 L/min

Kondisi Detektor PDA Detector Conditions

Acquisition Time	: None
Lamp	: Off
Wavelength	: None
Cell temperature	: Off

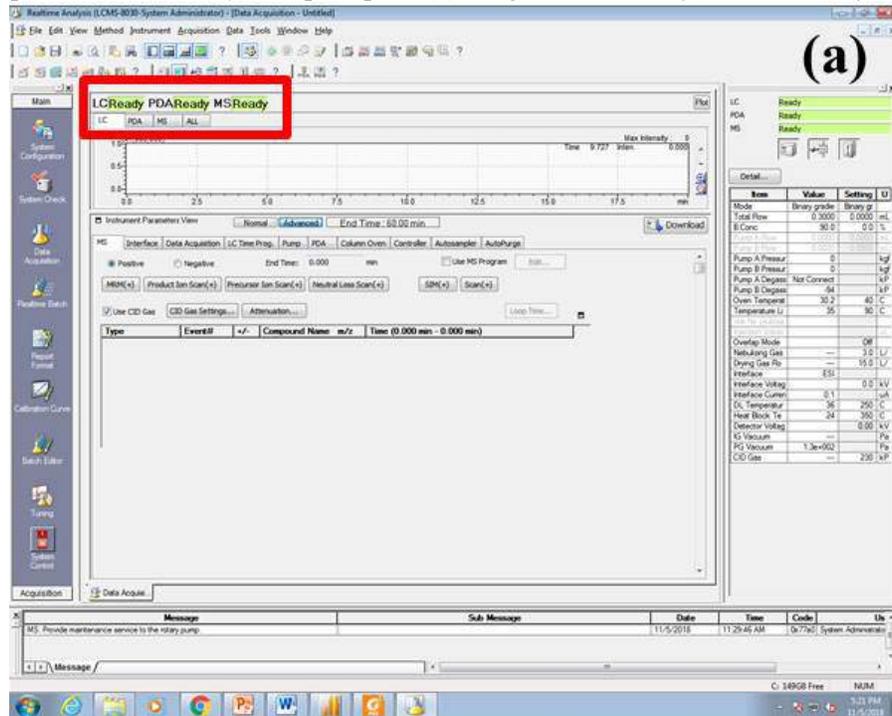
MS parameters setup

Scan Mode	: Q1 Scan
Accq. Time	: 0.8min
Start m/z	: 250
End m/z	: 380.00

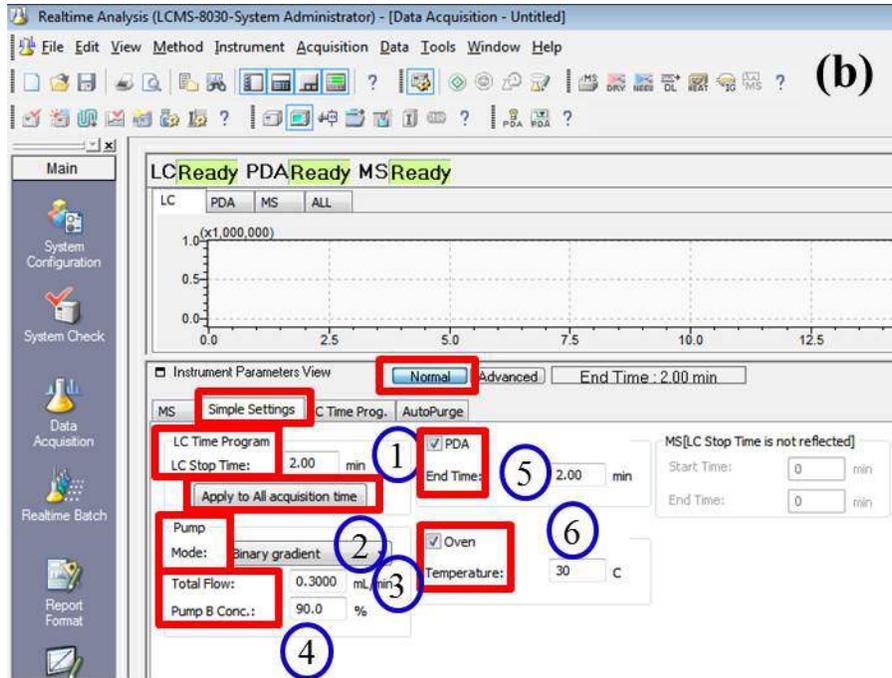
Event Time : 0.200sec

Langkah Kerja

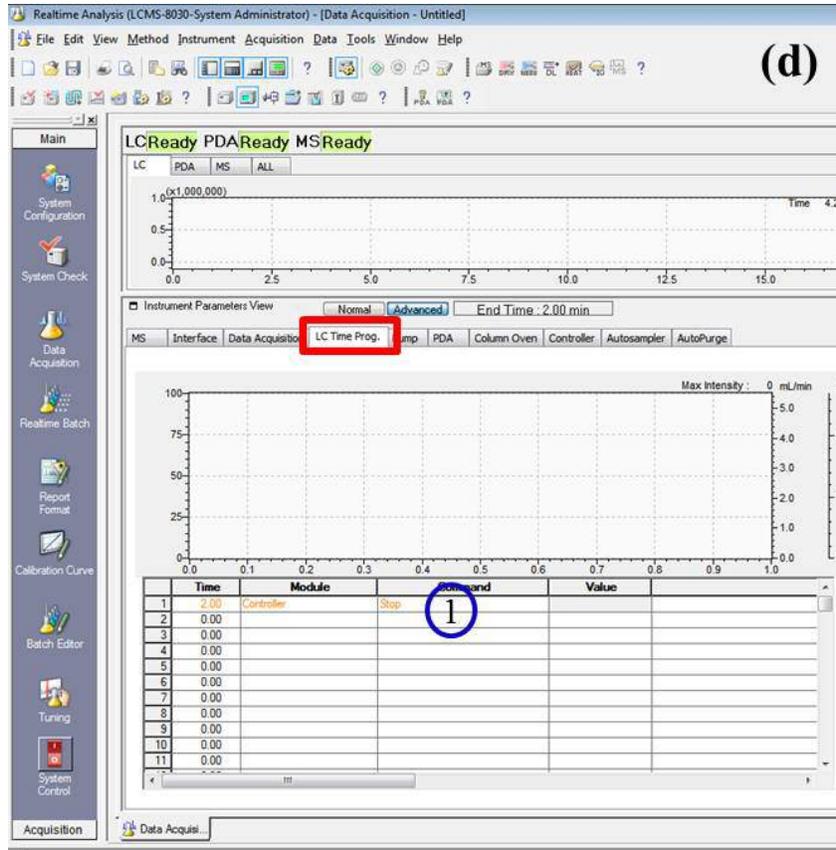
1. Membuat metode analisa karotenoid: mengatur parameter LC
 - ⇒ Komponen LCMS dihidupkan semuanya
 - ⇒ PC dihidupkan dan *software* LabSolutions dibuka
 - ⇒ *Software* LabSolutions sudah terkoneksi dengan komponen LCMS ditandai dengan bunyi tit (1 kali) dan tampilan *realtime analysis* seperti pada (a) dengan LC = Ready, PDA = Ready dan MS = Ready.



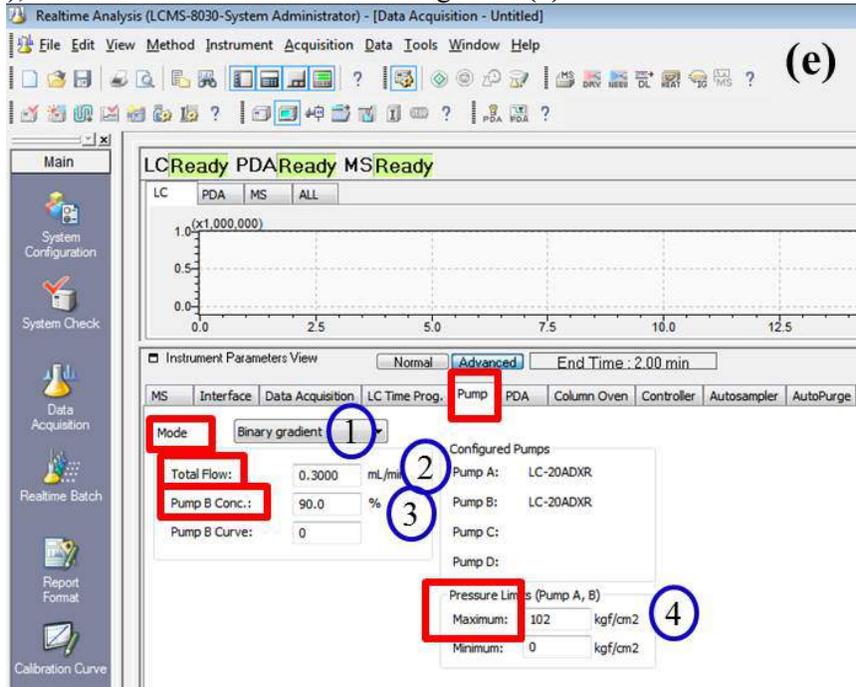
- ⇒ *Instrument parameter view* dipilih Normal, kemudian diatur pada window *Simple Settings* (b) yaitu *LC Stop Time* = 2 min (1) dan diklik *Apply to All acquisition time*, *Pump mode* = *Binary gradient* (2) dengan *Total Flow* = 0.3 mL/min (3) dan *Pump B Conc.* = 90% (4), *PDA End Time* = 2 min (5), *Oven Temperature* = 30°C (6)



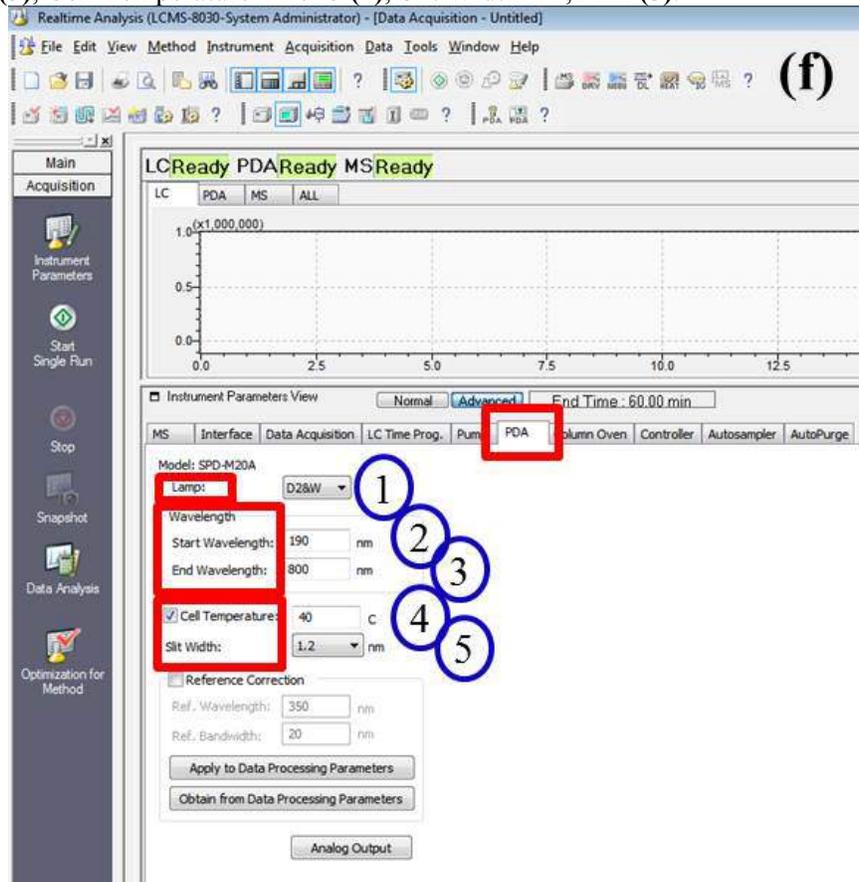
- ⇒ Instrument parameter view dipilih advanced, kemudian diatur data acquisition (c) dengan LC stop time 2 min (1), start time = 0 min (2) dan end time = 2 min (3). Jangan lupa klik Apply to All acquisition time.
- ⇒ LC time program (d) dengan informasi time = 2, module = controller, command = stop (1)



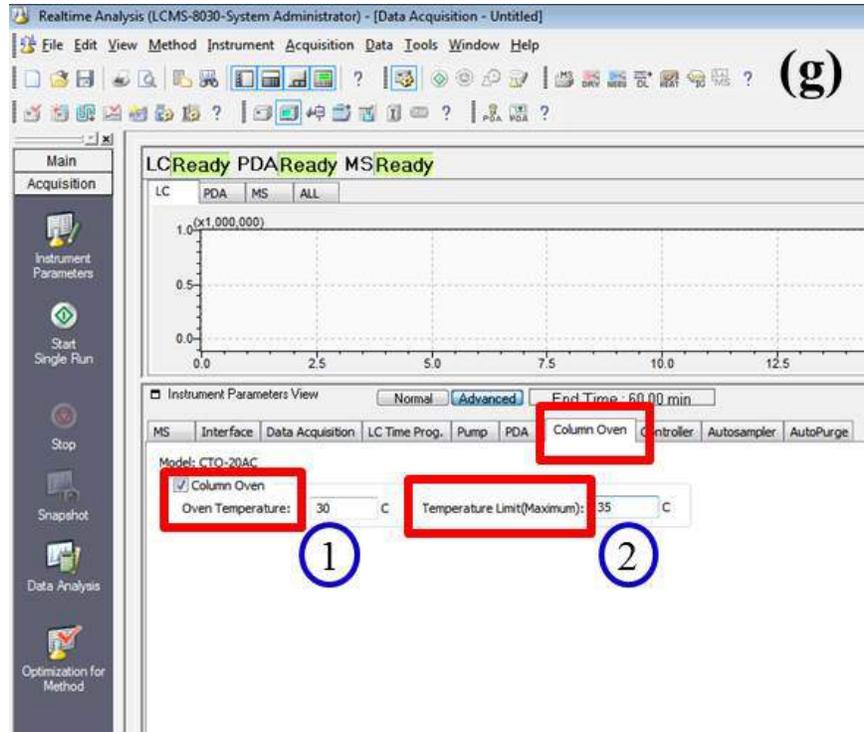
⇒ Pump (e) dengan mengatur Mode = Binary gradient (1), Total Flow = 0.3 mL/min (2), Pump B Conc. = 90% (3), Maximum Pressure Limits = 102 kgf/cm² (4)



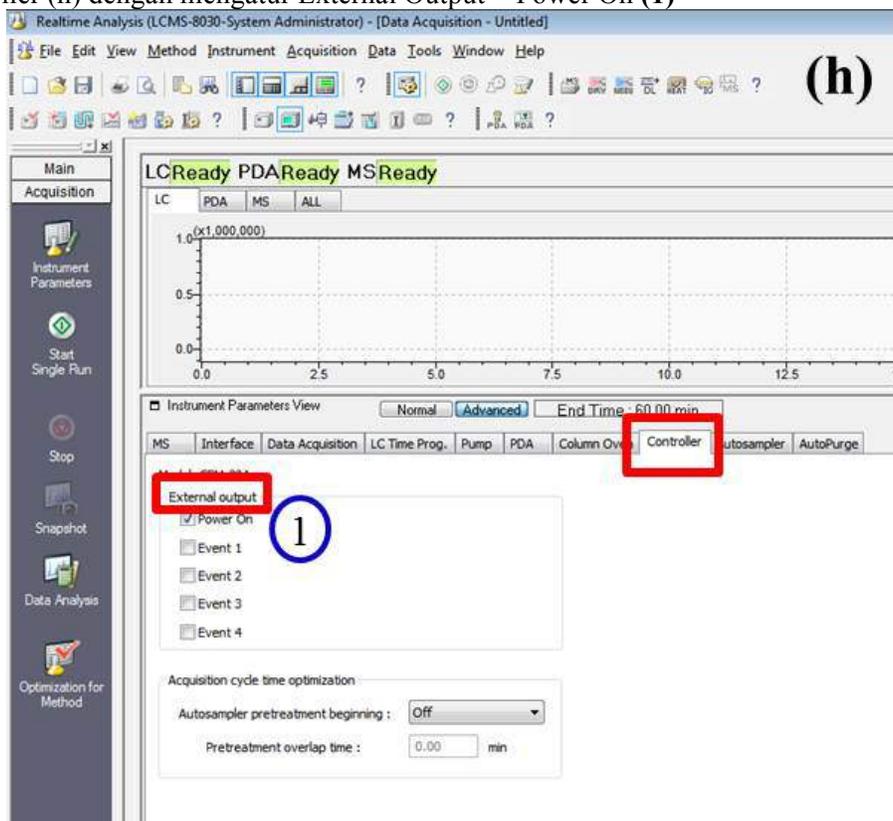
- ⇒ PDA (f) dengan mengatur Lamp = D2&W (1), Start Wavelength = 190 nm (2), End Wavelength = 190 nm (3), Cell Temperature = 40°C (4), Slit Width = 1,2 nm (5).



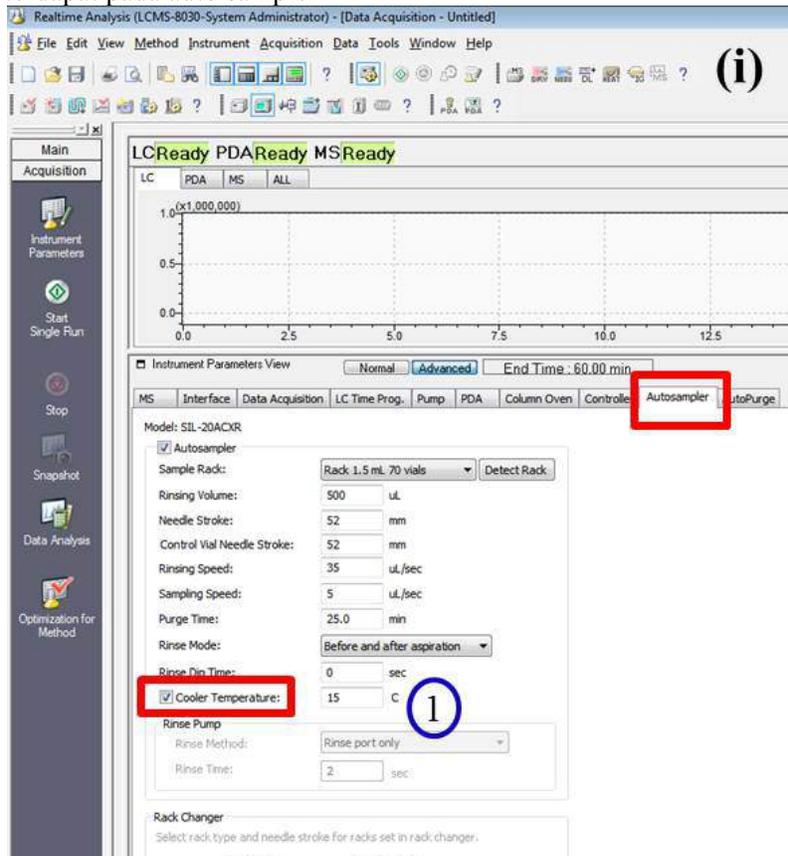
- ⇒ Column Oven (g) dengan mengatur Oven Temperature = 30°C (1), Temperature Limit (maximum) = 35°C (2)



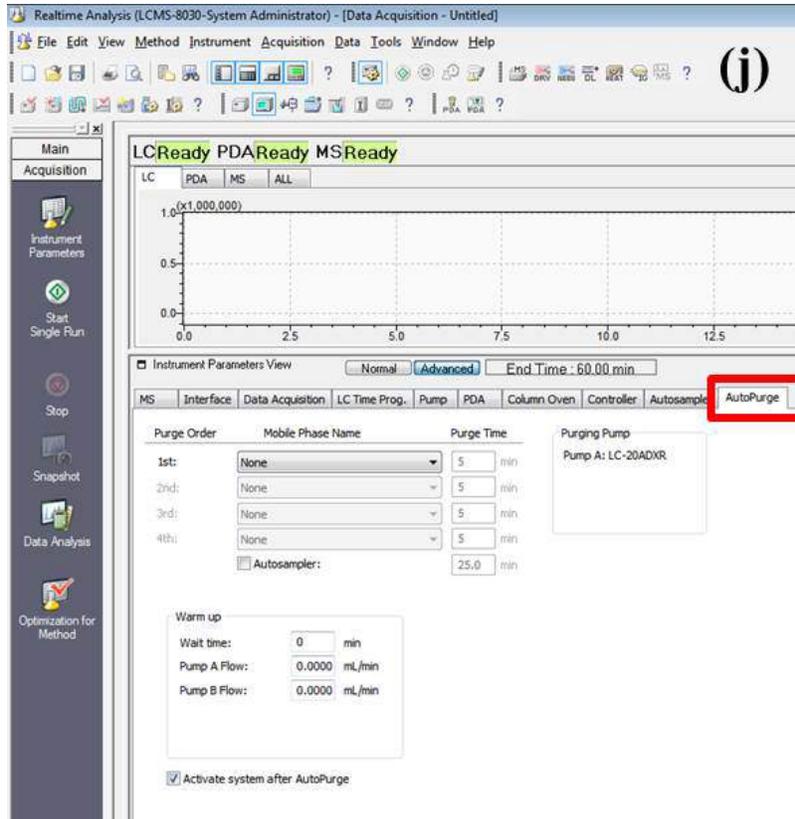
⇒ Controller (h) dengan mengatur External Output = Power On (1)



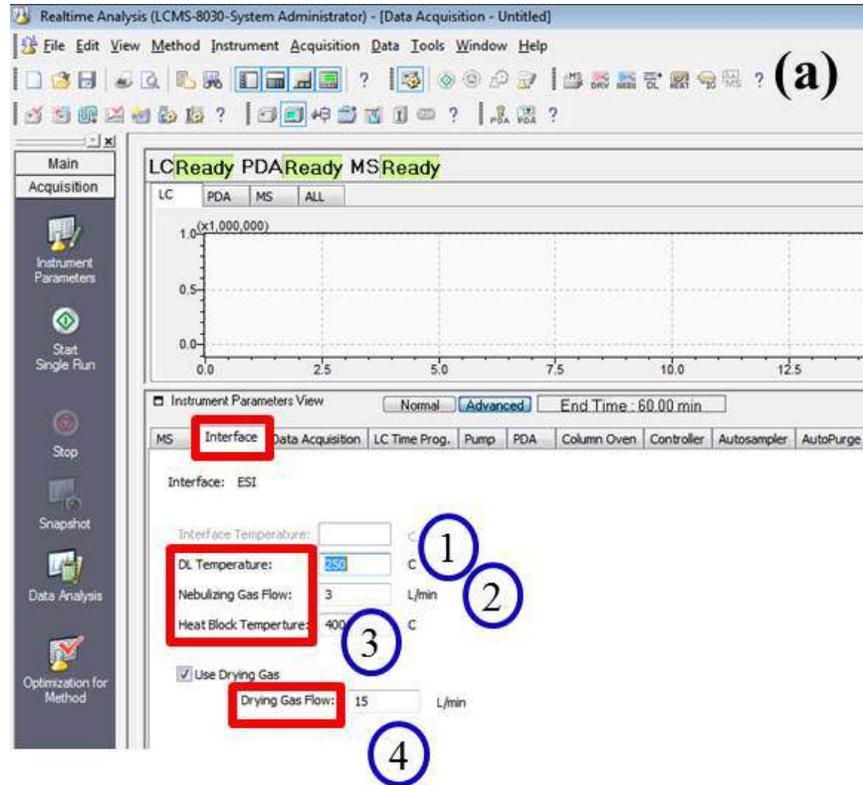
- ⇒ Auto sampler (i) dengan mengatur Cooler Temperature = 15°C (1), parameter lain sesuai dengan yang sudah terdapat pada auto sampler



- ⇒ AutoPurge (j) semua parameter sudah diatur.



2. Membuat metode analisa karotenoid: mengatur Interface MS
 - ⇒ Interface (a) dengan mengatur DL Temperature = 250°C (1), Nebulizing Gas Flow = 3 L/min (2), Heat Block Temperature = 400°C (3), Drying Gas Flow = 15 L/min (4)



3. Membuat metode Q1 dan Q3 Scan
 ⇒ Q1 dan Q3 scan (a), pilih muatan positif atau negatif (1) kemudian klik tombol Scan(+) (2) apabila ingin menggunakan metode scan. Untuk memilih Q1 atau Q3, pilih pada no (3) dengan Acq. Time 0-2 menit (4) dan Start m/z 200 (5) serta End m/z 700 (6). Kemudian atur Interface, LC Time Prog seperti cara di atas.

Realtime Analysis (LCMS-8030-System Administrator) - [Data Acquisition - Method Q1Q3 Scan Betakaroten MeOH-01FA no coloumn.lcm]

File Edit View Method Instrument Acquisition Data Tools Window Help

LCReady PDAReady MSReady

LC PDA MS ALL

1.0 (x1,000,000) Time

0.0 2.5 5.0 7.5 10.0 12.5 15.0

Instrument Parameters View Normal Advanced End Time: 2.00 min

MS Interface Data Acquisition LC Time Prog. Pump PDA Column Oven Controller Autosampler AutoPurge

Positive Negative End Time: 2.000 min Use MS Program Edit...

MRM(+) Product Ion Scan(+) Precursor Ion Scan(+) Neutral Loss Scan(+) SIM(+) Scan(+)

Use CID Gas CID Gas Settings... Attenuation... Loop Time...

Type	Event#	+/-	Compound Name	m/z	Time (0.000 min - 2.000 min)
Q3 Scan	1	+	200.00	700.00	
Q3 Scan	2	+	200.00	700.00	
Q1 Scan	3	-	200.00	700.00	
Q3 Scan	4	-	200.00	700.00	

Q3 Scan Acq. Time: 0 - 2 min Compound Name:

Start m/z: 200.00 End m/z: 700.00

Realtime Analysis (LCMS-8030-System Administrator) - [Data Acquisition - Method Q1Q3 Scan Betakaroten MeOH-01FA no coloumn.lcm]

File Edit View Method Instrument Acquisition Data Tools Window Help

LCReady PDAReady MSReady

LC PDA MS ALL

1.0 (x1,000,000) Time

0.0 2.5 5.0 7.5 10.0 12.5 15.0

Instrument Parameters View Normal Advanced End Time: 2.00 min

MS Interface Data Acquisition LC Time Prog. Pump PDA Column Oven Controller Autosampler AutoPurge

Positive Negative End Time: 2.000 min Use MS Program Edit...

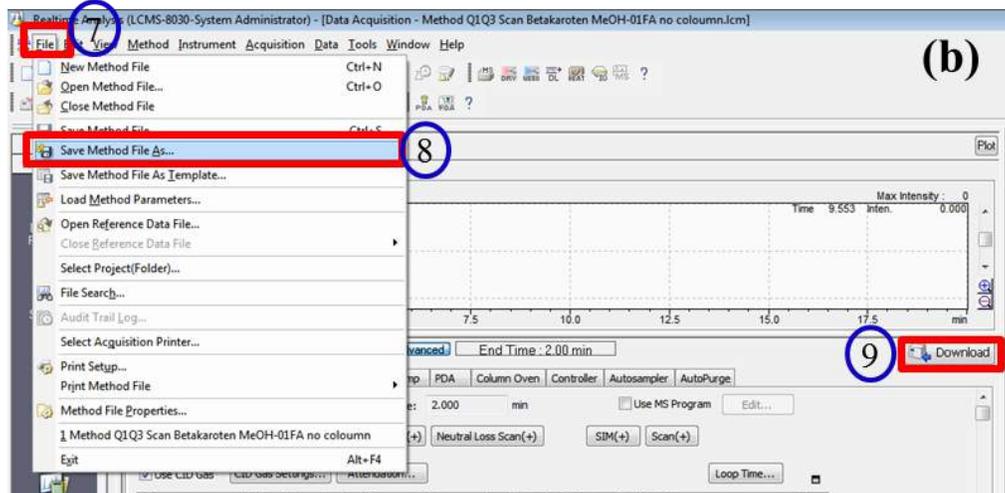
MRM(+) Product Ion Scan(+) Precursor Ion Scan(+) Neutral Loss Scan(+) SIM(+) Scan(+)

Use CID Gas CID Gas Settings... Attenuation... Loop Time...

Type	Event#	+/-	Compound Name	m/z	Time (0.000 min - 2.000 min)
Q3 Scan	1	+	200.00	700.00	
Q3 Scan	2	+	200.00	700.00	
Q1 Scan	3	-	200.00	700.00	
Q3 Scan	4	-	200.00	700.00	

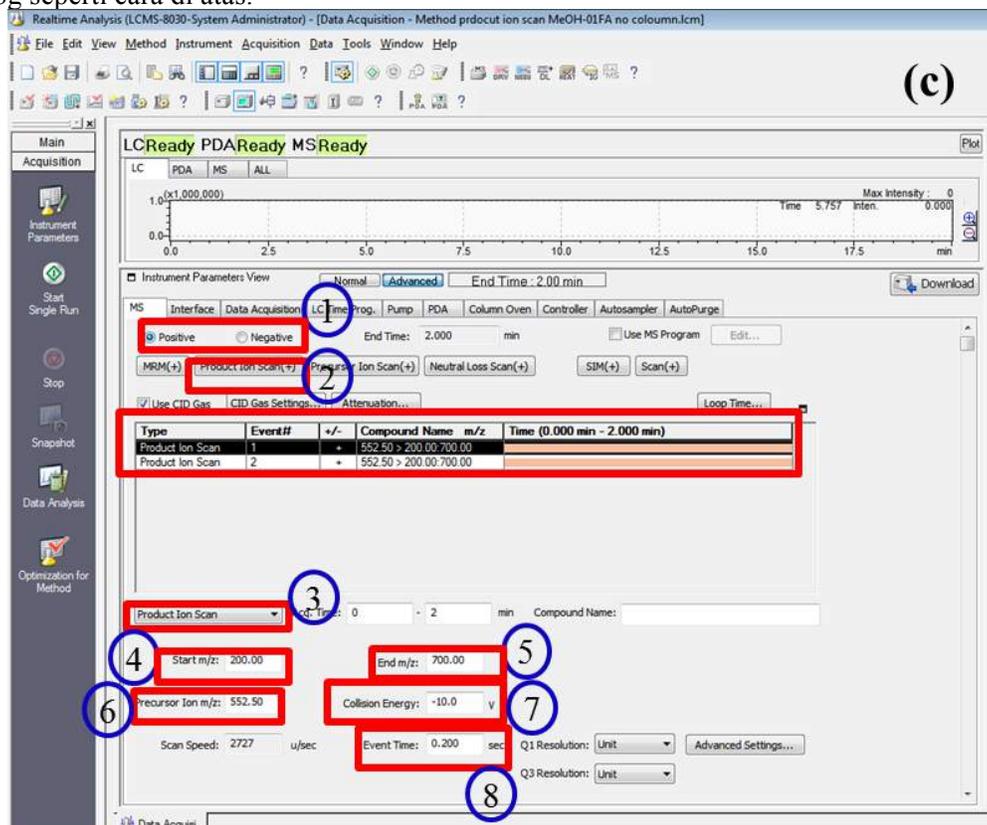
⇒ Penambahan *Event* dengan cara mengulangi langkah (1) – (6) dibedakan menjadi Q1 scan + (Event 1), Q3 scan + (Event 2), Q1 scan - (Event 3), dan Q3 scan - (Event 4).

- ⇒ Metode disimpan dengan cara **File (7) – Save Method File As (8)**. Kemudian untuk menjalankannya klik **Download (9) (b)**.

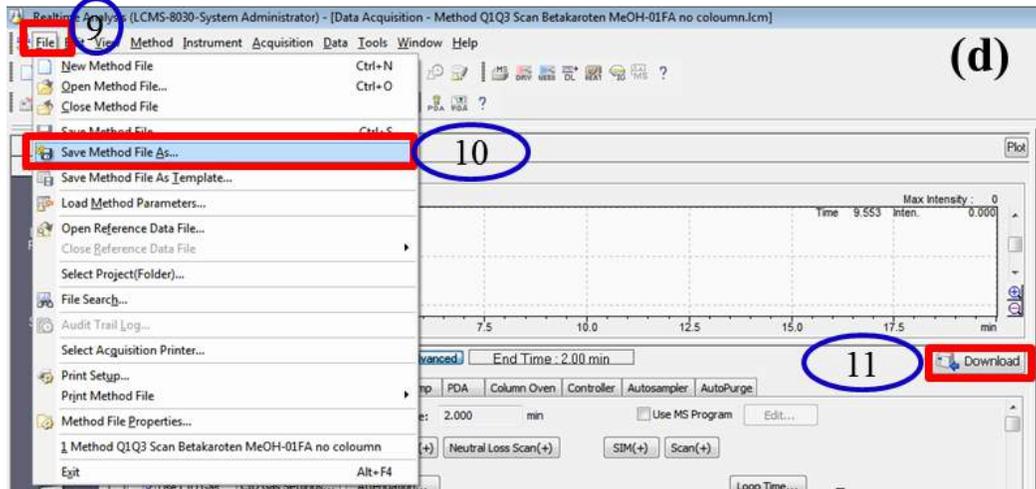


4. Membuat metode Product Ion Scan

- ⇒ Hasil Q1 dan Q3 *scan* dilihat *event* mana yang terdapat *Precursor Ion* dengan intensitas yang tinggi, dimana pada betakaroten terdapat pada Q1 dan Q3 (+). Sehingga pada metode Product Ion Scan (c), pilih muatan positif (1) klik tombol **Product Ion Scan(+)** (2). Pilih **Product ion Scan** (3) dengan **Start m/z 200** (4), **End m/z 700** (5), **Precursor Ion m/z 552.50** (sesuai hasil Q1 / Q3 scan) (6), **Collision energy (CE) -10V** (7), dan **Event Time 0.2 detik** (8). Kemudian atur Interface, LC Time Prog seperti cara di atas.

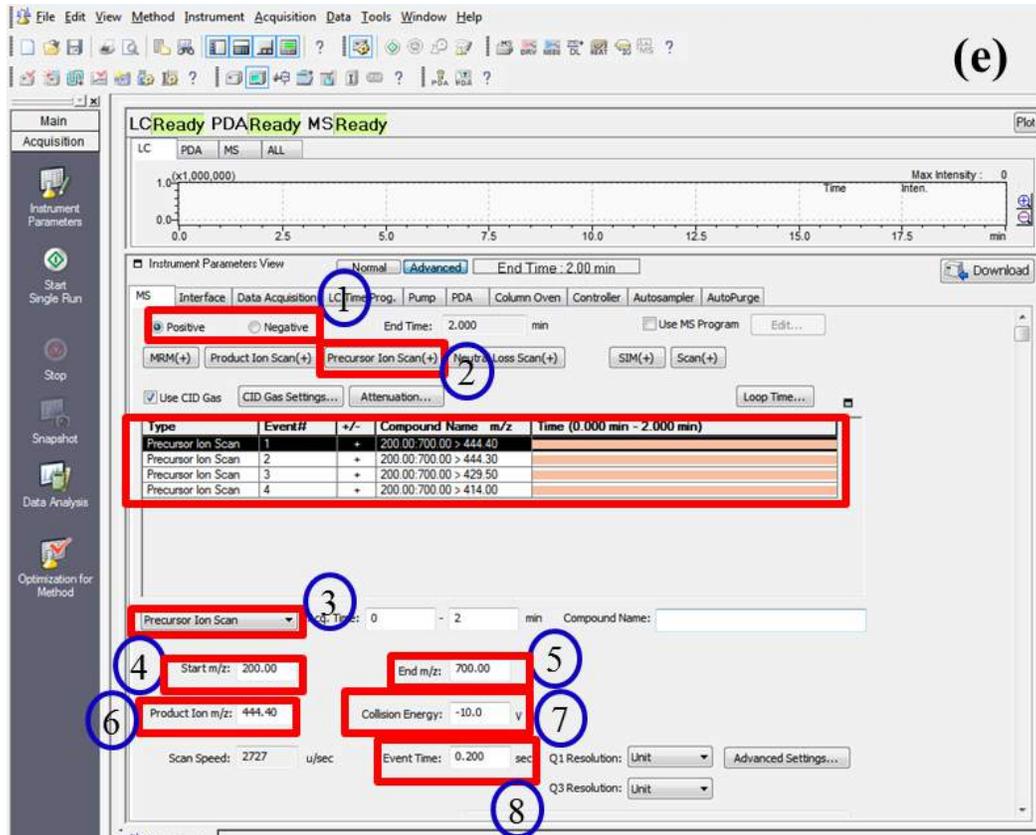


- ⇒ Penambahan *Event* dengan cara mengulangi langkah (1) – (8) dibedakan pada no (7) di mana *CE* menjadi **-35 V** sehingga Event 1 = **Product Ion Scan** dengan **CE -10 V** dan Event 2 = **Product Ion Scan** dengan **CE -35 V**.
- ⇒ Metode disimpan dengan cara *File* (9) – *Save Method File As* (10). Kemudian untuk menjalankannya *klik Download* (11) (d).

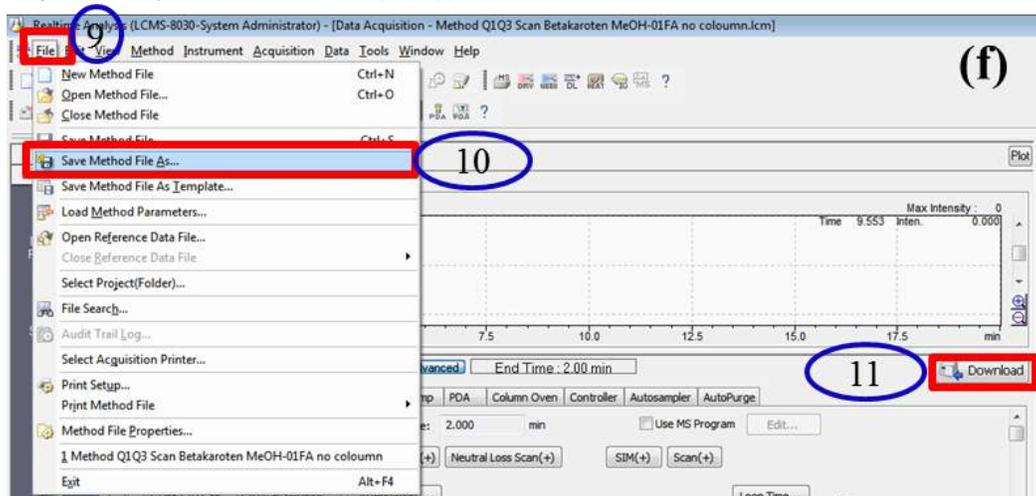


5. Membuat metode *Precursor Ion Scan*

- ⇒ Hasil *Product Ion Scan* terdapat beberapa ion produk . Ion-ion produk tersebut yang akan dimasukkan untuk mendeteksi ion prekursor. Pada metode *Precursor Ion Scan* (e), **pilih muatan positif** (1) **klik tombol Precursor Ion Scan(+)** (2). Pilih *Precursor Ion Scan* (3) dengan **Start m/z 200** (4), **End m/z 700** (5), **Product Ion m/z 444.40** (sesuai hasil *Product Ion scan*) (6), **Collision energy (CE) -10V** (7), dan **Event Time 0.2 detik** (8).



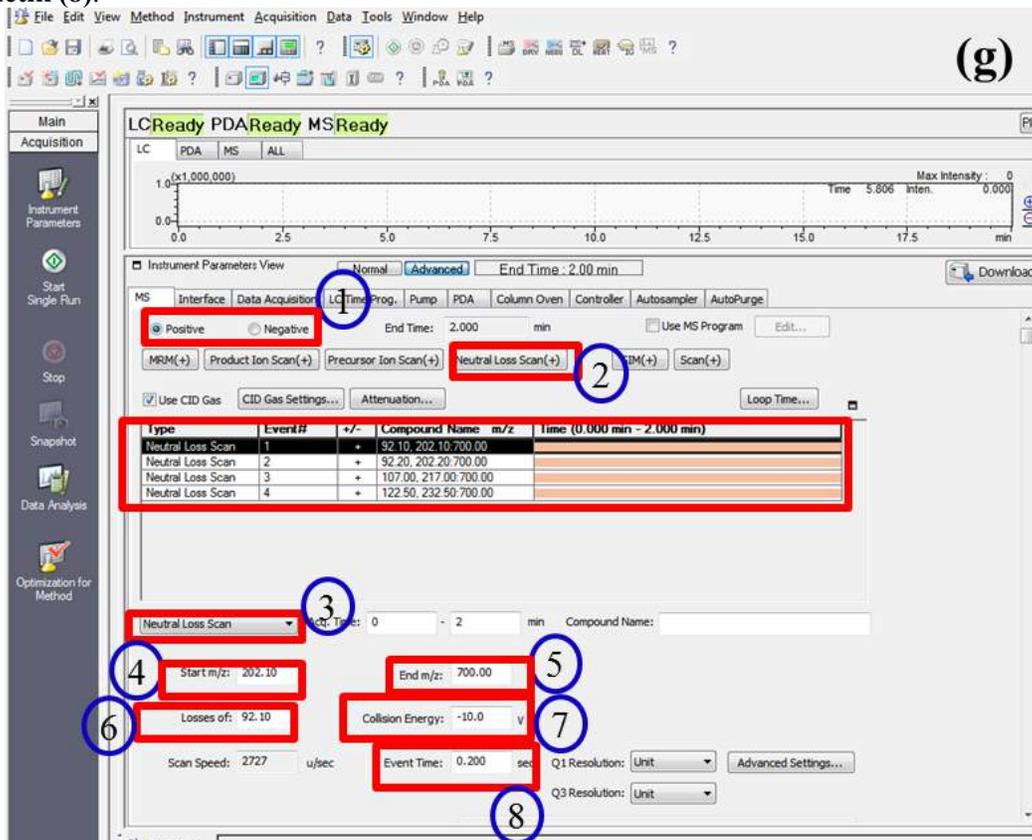
- ⇒ **Penambahan Event** dengan cara mengulangi langkah (1) – (8) dibedakan pada no (6) dimana **Product Ion** menjadi **444.30 (Event 2)**, **429.50 (Event 3)**, **414.0 (Event 4)** dan no (7) dimana **CE** menjadi **-35 V**, sedangkan **Event 1** adalah **Product Ion 444.40 m/z** dengan **CE -10 V**.
- ⇒ Metode disimpan dengan cara **File (9) – Save Method File As (10)**. Kemudian untuk menjalankannya **klik Download (11) (f)**.



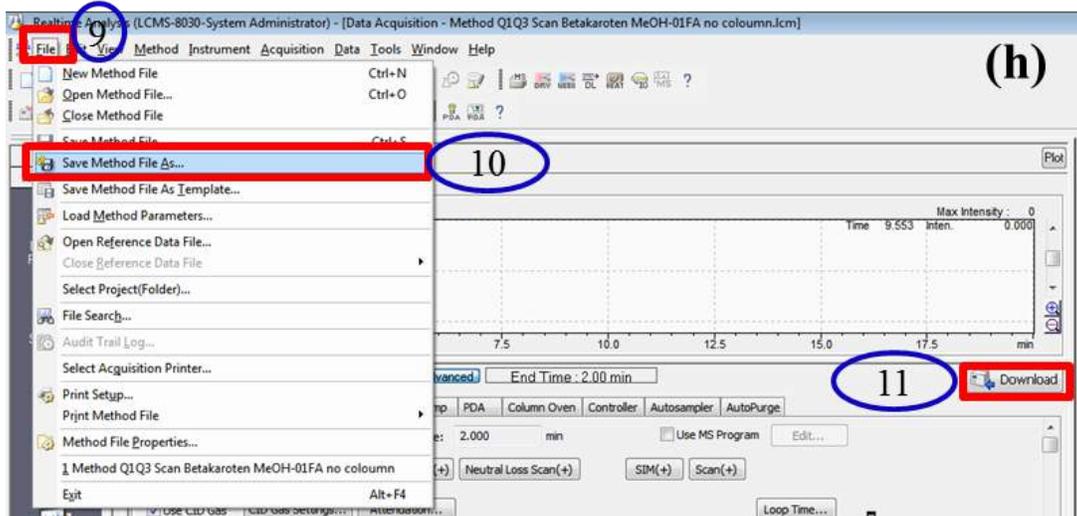
6. Membuat metode *Neutral Loss Scan*

- ⇒ Hasil **Precursor Ion** dikurangi dengan **Product Ion** untuk mendapatkan fragmen yang hilang (**Neutral loss**). Pada metode **Neutral loss Scan (g)**, pilih muatan positif (1) klik tombol **Neutral loss Scan(+)** (2). Pilih **Neutral loss Scan** (3) dengan **Start m/z 202.10** (4), **End m/z 700** (5), **Product**

Ion m/z 92.10 (sesuai hasil pengurangan) (6), ***Collison energy (CE) -10V*** (7), dan ***Event Time 0.2 detik*** (8).

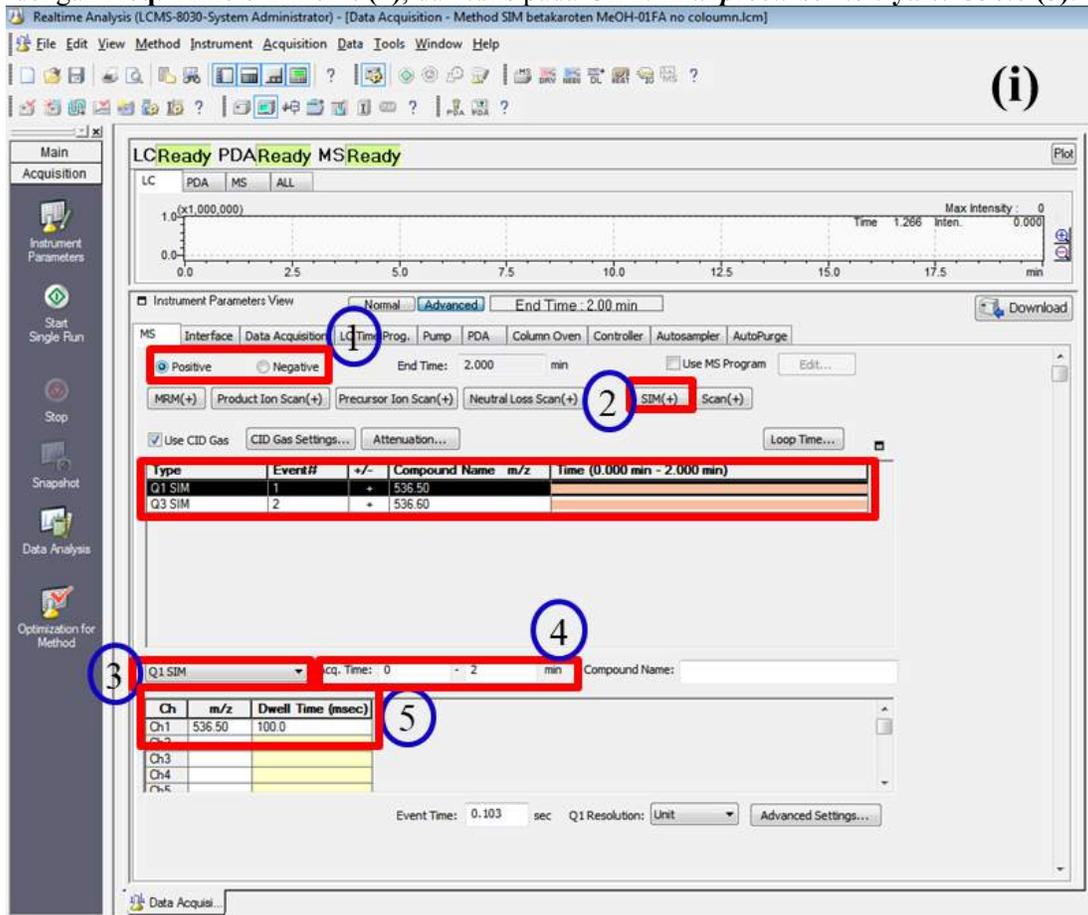


- ⇒ **Penambahan *Event*** dengan cara mengulangi langkah (1) – (8) dibedakan pada no (6) dimana ***Neutral loss*** menjadi **92.20 (Event 2), 107.00 (Event 3), 122.50 (Event 4)** dan no (7) dimana ***CE*** menjadi **-35 V**, sedangkan ***Event 1*** adalah ***Product Ion 92.10 m/z*** dengan ***CE -10 V***.
- ⇒ Metode disimpan dengan cara ***File*** (9) – ***Save Method File As*** (10). Kemudian untuk menjalankannya klik ***Download*** (11) (h).

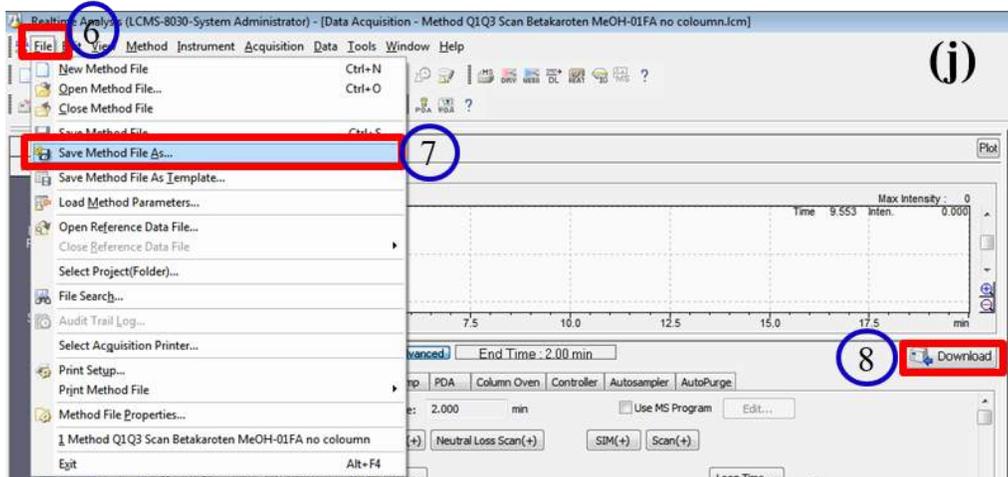


7. Membuat metode SIM

- ⇒ Pada metode SIM (i), pilih muatan positif (1) klik tombol SIM(+) (2). Pilih Q1/Q3 SIM (3) dengan Acq. Time 0-2 menit (4), dan tulis pada Ch 1. nilai precursor ion yaitu 536.0 (5).



- ⇒ Penambahan *Event* dengan cara mengulangi langkah (1) – (4) dibedakan pada no (3) dimana Q1 SIM (Event 1) menjadi Q3 SIM (Event 2).
 ⇒ Metode disimpan dengan cara *File* (6) – *Save Method File As* (7). Kemudian untuk menjalankannya klik *Download* (8) (j).



8. Membuat metode MRM

- ⇒ Pada metode MRM (k), pilih muatan positif (1) klik tombol MRM(+) (2). Pilih MRM (3) dengan Acq. Time 0-2 menit (4), dan tulis pada Ch 1.-Ch.3 nilai *precursor ion* yaitu 536.0, kemudian Product Ion berturut-turut adalah 444.35, 119.15, 105.20(5).

The screenshot shows the 'MS' configuration window in the software. The 'MS' tab is selected, and the 'Positive' radio button is chosen. The 'MRM(+)' button is highlighted with a red box and a circled '2'. Below this, a table lists MRM events:

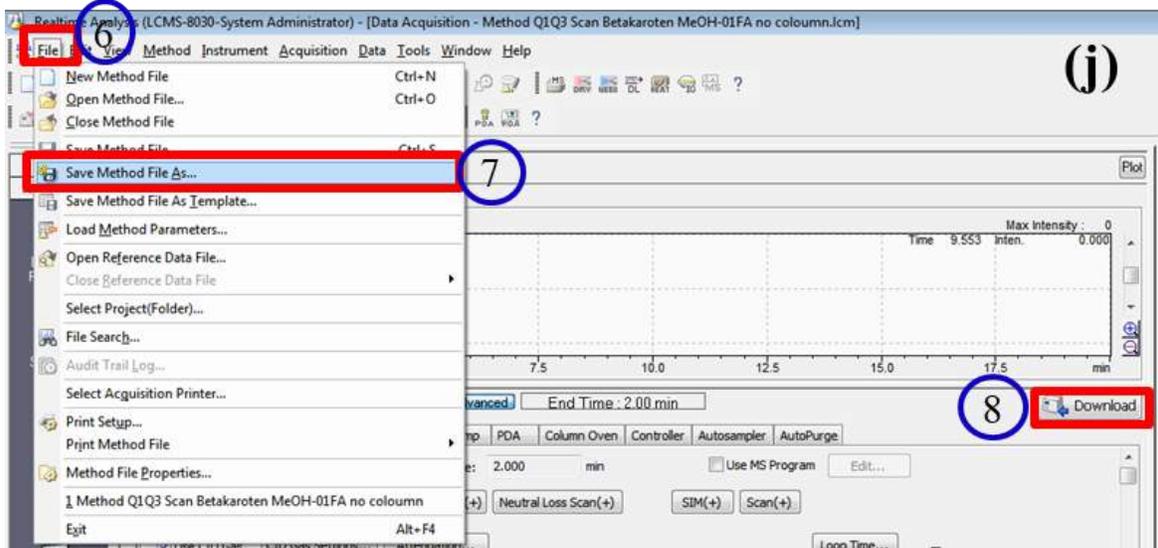
Type	Event#	+/-	Compound Name	m/z	Time (0.000 min - 2.000 min)
MRM	1	+	536.50>444.35, 536.50>119.1		
Q3 SIM	2	+	536.60		

Below the table, the 'MRM' dropdown is selected, and the 'Acq. Time' is set to 0 - 2 min. A second table shows the MRM parameters for three channels:

Ch	Precursor m/z	Product m/z	Dwell Time (msec)	Q1 Pre Bias(V)	CE	Q3 Pre Bias(V)
Ch1	536.50	444.35	100.0	-32.0	-16.0	-23.0
Ch2	536.50	119.15	100.0	-32.0	-40.0	-26.0
Ch3	536.50	105.20	100.0	-32.0	-55.0	-11.0
Ch4						
Ch5						

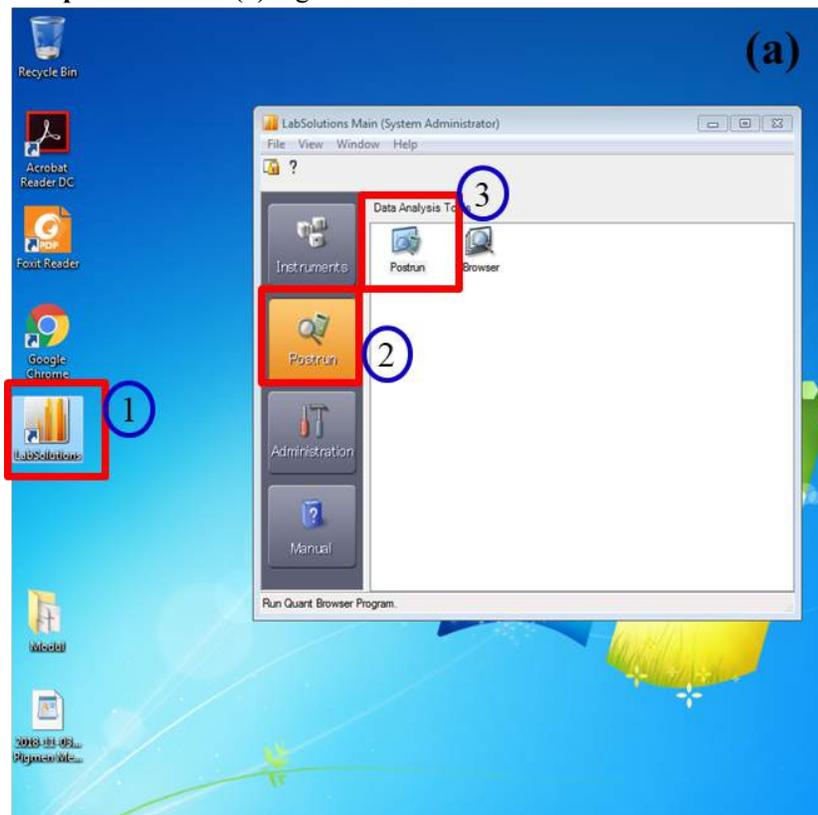
The 'MRM' dropdown and the table above are highlighted with a red box and a circled '3'. The 'Download' button at the bottom right is highlighted with a red box and a circled '4'.

- ⇒ **Penambahan Event** dengan cara mengulangi langkah (1) – (4) dibedakan pada no (3) dimana Q1 SIM (Event 1) menjadi Q3 SIM (Event 2).
- ⇒ Metode disimpan dengan cara **File (6) – Save Method File As (7)**. Kemudian untuk menjalankannya klik **Download (8) (1)**.

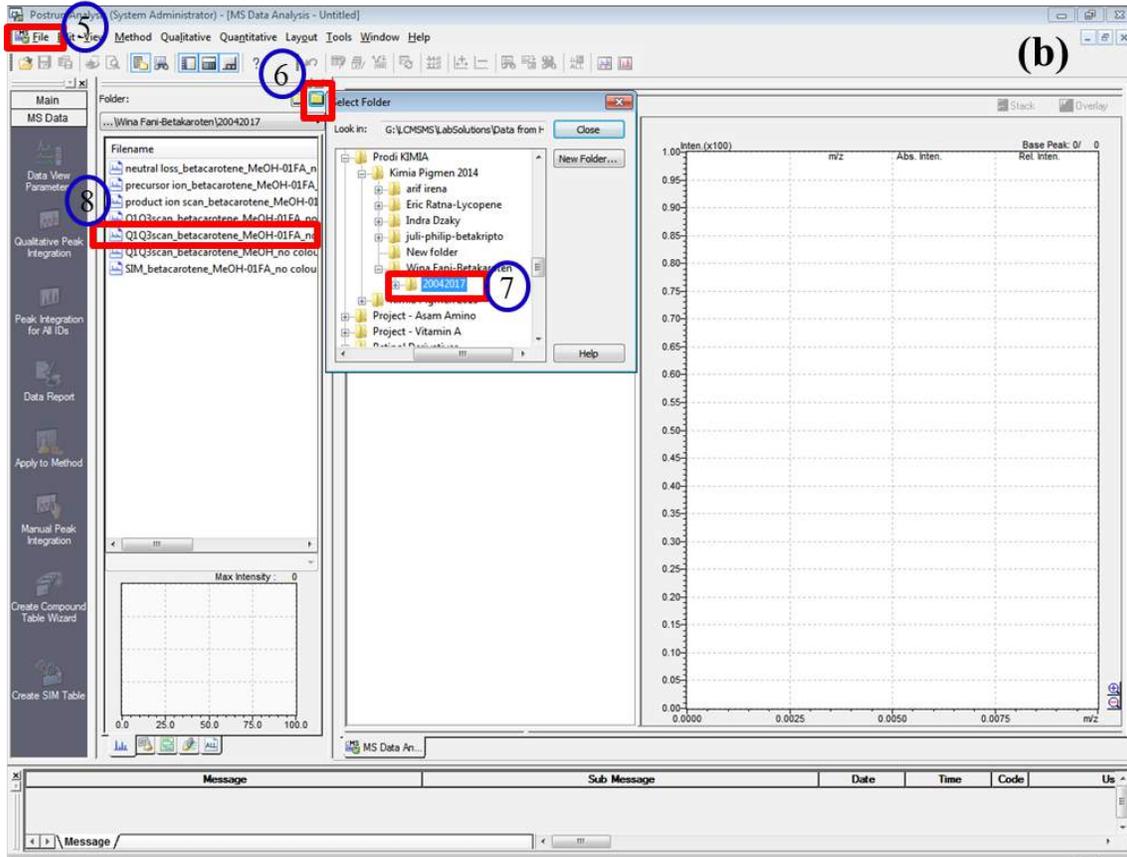


Melakukan Analisa Data

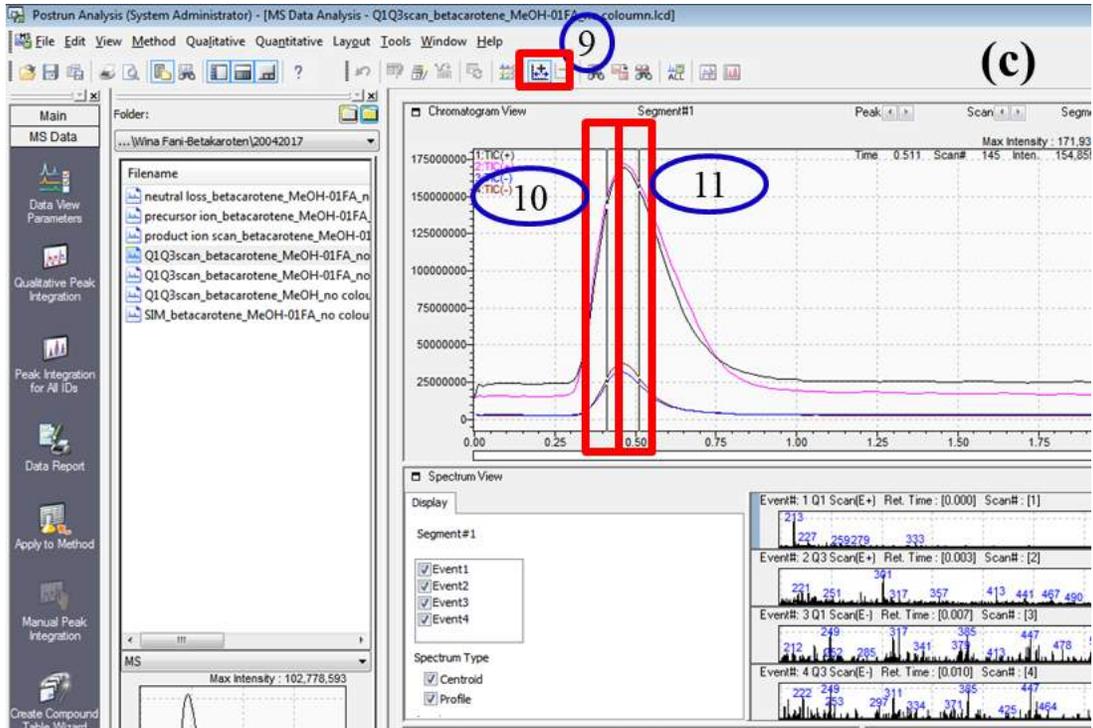
- ⇒ Apabila LCMS sudah selesai mengidentifikasi sampel, untuk membuka file (a) caranya dengan membuka *software* LabSolutions (versi 5.53) (1), kemudian pilih Postrun (2) dan pada Data Analysis Tool pilih Postrun (3) lagi.



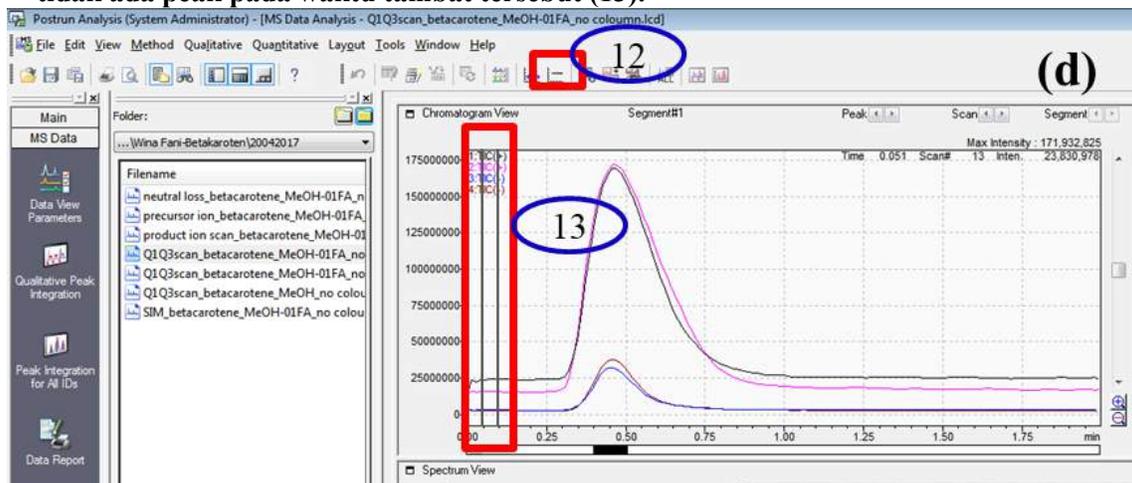
- ⇒ Setelah program Postrun terbuka, klik File (4) – Select Project (5) – pilih folder tempat file yang diinginkan (6) – pilih file (7) (b).



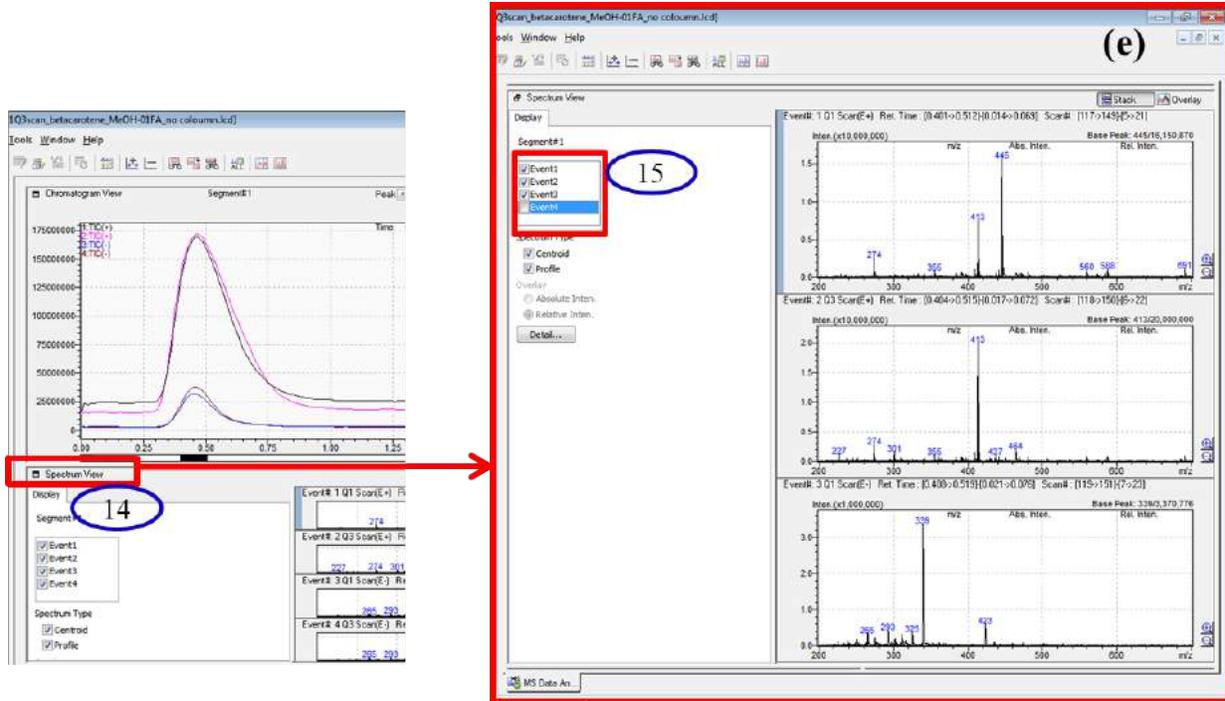
- ⇒ Setelah itu, untuk mendapatkan spektrum massa dari peak betakaroten saja, tanpa campuran peak lain (c), caranya adalah pilih tanda + (8) kemudian pada kromatogram klik pada waktu tambat awal terbentuknya peak betakaroten (9) kemudian ditahan (drag) sampai waktu tambat berakhirnya terbentuk peak betakaroten (10).



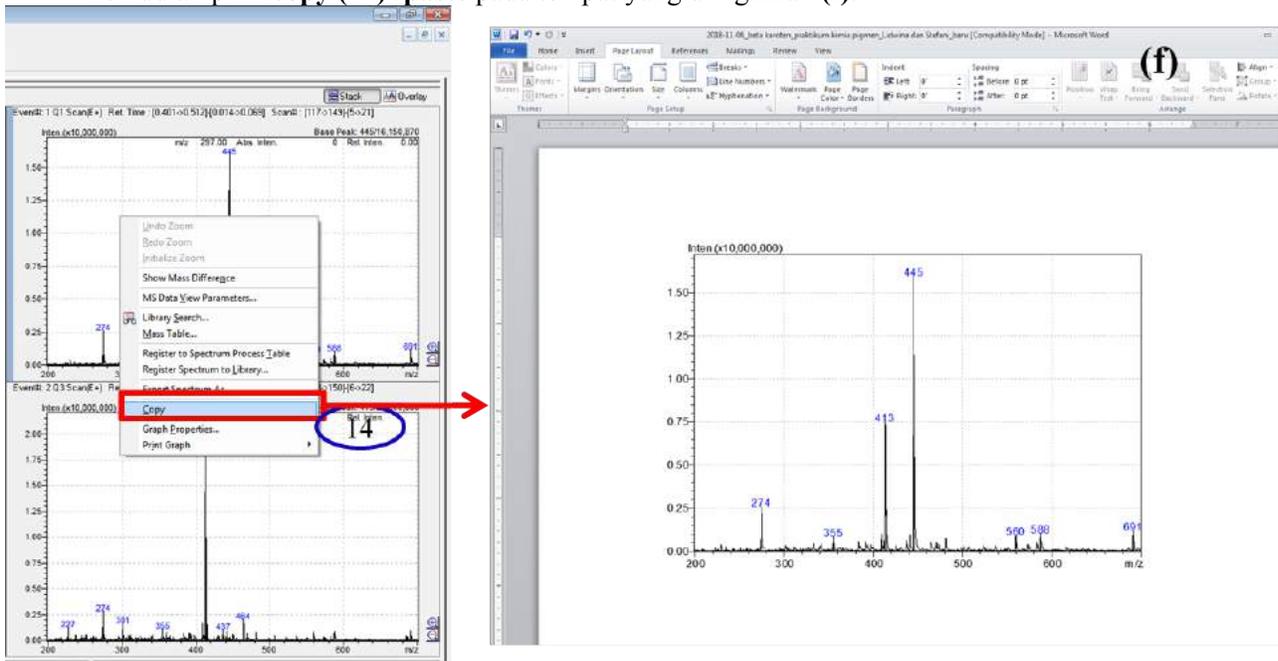
- ⇒ Setelah itu dikurangi (d) dengan cara memilih tanda – (12), klik bagian di kromatogram dimana tidak ada peak pada waktu tambat tersebut (13).



- ⇒ Kemudian untuk melihat kromatogram hasil spektrum massa betakaroten (e), klik Spectrum View (14). Untuk memilih ingin melihat atau tidak ingin melihat Event 1, Event 2, Event3, dan Event 4 tinggal mencentang dan menghilangkan tanda centang (15)

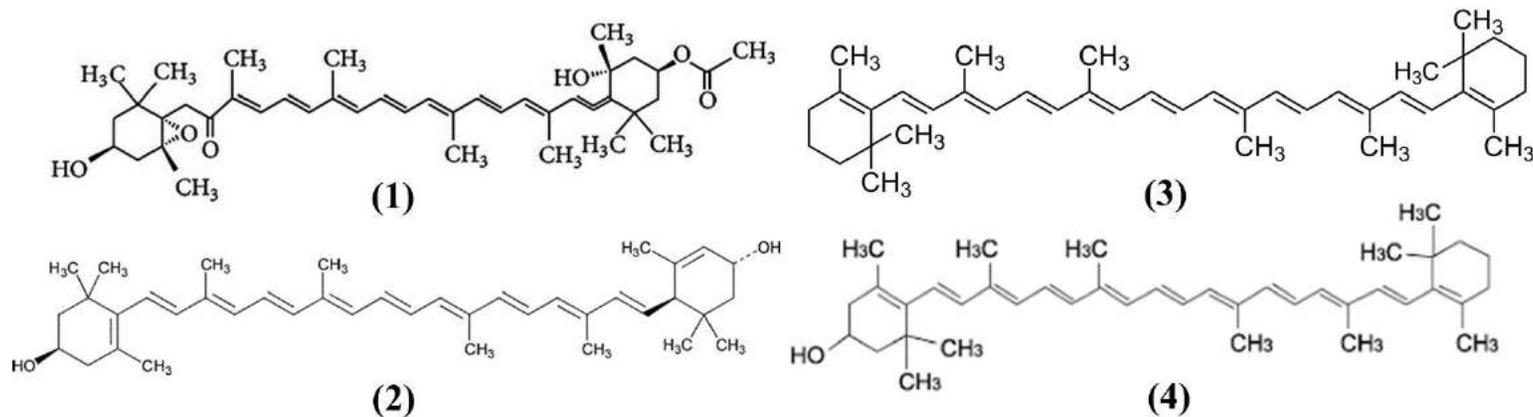


⇒ Untuk mengambil data secara langsung dapat dengan cara **klik kanan pada kromatogram** kemudian pilih **copy (14) -paste** pada tempat yang diinginkan (f).



Tabel 1. Daftar karotenoid beserta struktur molekul, stuktur formula, exact mass serta hasil dari analisa menggunakan LCMSMS

No	Karotenoid	Formula	Exact Mass	Precursor ion (m/z)	Fragment ions (m/z)	Q1 Pre bias (V)	C.E. Value (V)	Q3 Pre bias (V)
1	Fukosantin	C ₄₂ H ₅₈ O ₆	658,4					
2	Lutein	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4					
3	β-karoten	C ₄₀ H ₅₆	536,4					
4	β-kriptoksantin	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4					



Gambar 1. Struktur molekul dari 4 karotenoid yaitu fukosantin (1), lutein (2), β-karoten (3) dan β-kriptoksantin (4)

Daftar Pustaka

- Anderson, J.M., Blass, U. dan Calvin, M., 1960. Dalam: comparative biochemistry of photoreactive systems, Allen, M.B., ed., 215-225. Academic Press, New York dan London
- Anderson, J. M. dan Boardman, N. K., 1964. Studies on The Greening of Dark-Grown Bean Plants II. Development of Photochemical Activity, *Australian Journal of Biological Sciences*, 17, 93-101.
- Arnon, D. I., 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*, *Plant Physiol*, 24, 1-15.
- Association of Official Analytical Chemists, 1995. Official methods of analysis of the association of official analytical chemist. AOAC, Washington, DC. C.34, 8.
- Astawan, Made., Kasih, dan Andreas L., 2008. Khasiat warna-warni Makanan. Gramedia. Pustaka Utama, Jakarta
- Bacon, M.F., 1965. Separation of chlorophylls a and b and related compounds by thin-layer chromatography on cellulose, *J. Chromatogr.*, 17, 322-326.
- Bacon, M.F., 1966. Artifacts from chromatography of chlorophylls, *Biochem Journal*. 101(2), 34C-36C.
- Bacon, M.F. dan Holden, M., 1967. Changes in chlorophylls resulting from various chemical and physical treatments of leaves and leaf extracts, *Phytochemistry*, 6(2), 193-210.
- Boardman, N. K. dan Thorne, S. W., 1971. Sensitive fluorescence method for the determination of chlorophyll a-chlorophyll b ratios, *Biochim Biophys Acta*, 253, 222-231.
- Britton, G., dan Goodwin, T. W., 1971. Biosynthesis of carotenoids. Dalam: *Methods in Enzymology*, vol. 18C, D. B. McCormick and Wright, eds. Academic Press, New York, pp. 654-701.
- Bruinsma, J., 1963. The Quantitative Analysis of Chlorophyll a and b in Plant Extracts *Photochemistry and Photobiology*, 2, 241-249.
- Buckle, K.A. dan Edwards, R.A., 1969. Chlorophyll degradation products from processed pea purée, *Phytochemistry*, 8(10), 1901-1906.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R. dan Stanier, R. Y., 1957. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria, *J Cell Comp Physiol*, 49, 25-68.
- Comar, C. L. dan Zscheile, F. P., 1942. Analysis of Plant Extract for Chlorophylls a and b by Photoelectric Spectrophotometric Method *Plant Physiol*, 17, 198-209.
- Chu, T.C. dan Chu, J.H., 1966. The Heptacarboxylic Porphyrin of Various Types of Porphyrin and the Melting-Point Curve of Methyl Esters of the I and III Isomers, *Clinical Chemistry*, 12(10), 647-658.
- Choo, Y. M., 1994. Palm Oil Carotenoid. The United Nations University Press Food and Nutrition Bulletin, Vol. 15.
- Daley, R. J., Gray, C. B. J. dan Brown, S. R., 1973a. Reversed-phase thin-layer chromatography of chlorophyll derivatives, *J. Chromat.*, 76, 175-183.
- Daley, R. J., Gray, C. B. J. dan Brown, S. R., 1973b. A Quantitative, Semiroutine Method for Determining Algal and Sedimentary Chlorophyll Derivatives, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 30, 345-356.
- Davies, B. H., 1976. Carotenoids. Dalam: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, vol. 2, T. W. Goodwin, ed. Academic Press, London, pp. 38-165.
- De Ritter, E., dan Purcell, A.E., 1981. Carotenoid analytical methods. Dalam: *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*, J.C. Bauernfeind, ed. Academic Press, New York, pp. 815-882.
- Downey, W.K., Murphy, R.F., dan Keogh, M.K., 1970. Separation of fatty acids, phospholipids and chloroplast pigments on Sephadex LH-20, *Journal of Chromatography A*, 46, 120-124.
- Ellsworth, R.K. dan Nowak, C.A., 1973. A method for the biological preparation and thin-layer chromatographic purification of 14 C-protochlorophyllide a, *Anal. Biochem.*, 51(2), 656-662.
- Evans, M. B. Cogdell, R. J. dan Britton, G., 1988. Determination of the bacteriochlorophyll:carotenoid ratios of the B890 antenna complex of *Rhodospirillum rubrum* and the B800-850 complex of *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochemica et Biophysica Acta*, 935, 292-298.
- Frank, H. A. dan Cogdell, R. J. 1993. The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. Dalam: *Carotenoids in Photosynthesis*. (Young, A., and Britton, G., ed). Chapman & Hall, London. 252-326.

- French, C. S., Brown, J. S. dan Lawrence, M. C., 1972. Four universal forms of chlorophyll a, *Plant Physiol*, 49, 421-429.
- Friend, D.J.C., 1960. The control of chlorophyll accumulation in leaves of marquis wheat by temperature and light intensity, *Physiologia Plantarum*, 13, 776-785.
- Garside, C. dan Riley, J.P., 1969. A thin-layer chromatographic method for the determination of plant pigments in sea water and cultures, *Anal. Chim. Acta.*, 46(2), 179-191.
- Gouterman, M., 1978. Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings. Dalam: *The Porphyrins*, ed. D. D., Academic Press, New York, 1978, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220103-5.50008-8>, pp. 1-165.
- Goodwin, R. H., 1947. Fluorometric method for estimating small amounts of chlorophyll a. *Anal. Chem.* 19,789-794.
- H., A., C., G. E. and R., S., 1966. Die Auftrennung der Chlorophylle durch Gegenstromextraktion, *Helvetica Chimica Acta*, 49, 851-854.
- Heriyanto, Juliadiningsy, A.D., Shioi, Y., Limantara, L., dan Brotosudarmo, T.H.P., 2017. Analysis of Pigment Composition of Brown Seaweeds Collected from Panjang Island, Central Java, Indonesia. *Philippine Journal of Science*, 146: 323-330.
- Hanson, L. K., 1988. Theoretical Calculations of Photosynthetic Pigments, *Photochemistry and Photobiology*, 47, 903-921.
- Hager, A. dan Meyer-Bertenrath, T., 1966. Extraction and quantitative determination of carotenoids and chlorophylls of leaves, algae and isolated chloroplasts with the aid of thin-layer chromatography, *Planta*, 69(3), 198-217.
- Holden, M., 1961. The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase. *Biochemical Journal*, 78(2), 359-364.
- Holden, M., 1965. Chlorophyll bleaching by legume seeds, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 16, 312-325.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C. J., Holmes, R. W. dan Strickland, J. D. H., 1965. Fluorometric Determination of Chlorophyll, *ICES Journal of Marine Science*, 30, 3-15.
- Houssier, C. dan Sauer, K., 1969. Optical properties of the protochlorophyll pigments II. Electronic absorption, fluorescence, and circular dichroism spectra, *Bioenergetics*, 172(3), 492-502.
- Hynninen, P. H. dan Ellfolk, N., 1973. Use of the aqueous formic acid-chloroform-dimethylformamide solvent system for the purification of porphyrins and hemins, *Acta Chem Scand*, 27, 1795-1806.
- Hynninen, P.H. dan Ellfolk, N., 1973a. Chlorophyll I. Separation and isolation of chlorophyll a and b by multiple liquid-liquid partition. *Acta chem. Scand.* 27 : 1463-1477
- Iriyama, K., Yoshiura, M., Ishii, T. dan Shiraki, M., 2006. An Improved Method for the Preparation of Chlorophyll by Means of Column Chromatography with Sepharose CL-6B, *Journal of Liquid Chromatography*, 4, 533-538.
- Jeffrey, S. W., 1963. Purification and properties of chlorophyll c from *Sargassum flavicans*. *Biochemical Journal*, 86(2), 313-318.
- Jeffrey, S. W., 1972. Preparation and some properties of crystalline chlorophyll c1 and c2 from marine algae, *Biochim Biophys Acta*, 279, 15-33.
- Jeffrey, S.W., 1968. Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae, *Biochim Biophys Acta*, 162(2), 271-285.
- Jeffrey, S. W., 1969. Properties of two spectrally different components in chlorophyll c preparations, *Biochim Biophys Acta*, 177, 456-467.
- Jeffrey, S. W. dan Allen, M. B., 1967. A Paper Chromatographic Method for the Separation of Phytoplankton Pigments at Sea, *Limnology and Oceanography*, 12, 533-537.
- Jeffrey, S. W. dan Humphrey, G. F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1, and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton., *Biochem Physiol Pflanz*, 167, 191-194.
- Jeffrey, S. W. dan Welschmeyer, N. A., 1997. Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. Dalam: *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*, eds. S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura and S. W. Wright, UNESCO Publisher, Paris, 1997, pp. 597-621.
- Jones, O.T.G., 1963. The inhibition of bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodospseudomonas spheroides* by 8-hydroxyquinoline, *Biochem. Journal*, 88(2), 335-343.

- Jones, O.T.G., 1963. Magnesium 2,4,-divinylphaeoporphyrin A₅ monomethyl ester, a protochlorophyll-like pigment produced by *Rhodospseudomonas spheroides*, *Biochem. Journal*, 89(2), 182-189.
- Jones, I.D., Bennett, L.S., dan White, R.C., 1967. Recording of thin layer chromatograms on Polacolor film under ultraviolet, *J. Chromat.* 30 : 622-625.
- Jones, I.D., Butler, L.S., Gibbs, E., dan White, R.C., 1972. An evaluation of reversed phase partition for thin-layer chromatographic identification of chlorophylls and derivatives, *J. Chromatogr.*, 70, 87-98.
- Jones, I.D., Butler, L.S., Gibbs, E., dan White, R.C., 1972. Thin-layer chromatographic identification of zinc and copper complexes of pheophytins and pheophorbides in mixtures with chlorophylls and derivatives, *J. Chromatogr.*, 70, 206-209.
- Kaplan, I.R. dan Silberman, H., 1959. Spectroscopy of bacterial chlorophylls separated by paper and cellulose column chromatography, *Arch. Biochem. Biophys.*, 80(1), 114-124.
- Klein, S. dan Schiff, J. A., 1972. The Correlated Appearance of Prolamellar Bodies, Protochlorophyll(ide) Species, and the Shibata Shift during Development of Bean Etioplasts in the Dark, *Plant Physiology*, 49, 619-626.
- Koski, V. M., 1950. Chlorophyll formation in seedlings of *Zea mays* L, *Arch Biochem*, 29, 339-343.
- Koski, V. M. dan Smith, J. H., 1948. The isolation and spectral absorption properties of protochlorophyll from etiolated barley seedlings, *J Am Chem Soc*, 70, 3558-3562.
- Kirk, J., 1968. Studies on the Dependence of Chlorophyll Synthesis on Protein Synthesis in *Euglena gracilis*, together with a Nomogram for Determination of Chlorophyll Concentration. *Planta*, 78(2), 200-207.
- Kuhn, R. dan Lederer, E., 1931. Ueber α - und β -carotin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 200:246-254
- Kuki, M., Nagae, H., Cogdell, R. J., Shimada, K., dan Koyama, Y. 1994. Solvent effect on spheroidene in nonpolar and polar solutions and the environment of spheroidene in the light-harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 as revealed by the energy of the $^1A_g^- \rightarrow ^1B_u^+$ absorption and the frequencies of the vibronically coupled C=C stretching Raman lines in the $^1A_g^-$ and $^1B_u^-$ states. *Photochem Photobiol* 59:116-124.
- Lascelles, J., 1956. The synthesis of porphyrins and bacteriochlorophyll by cell suspensions of *Rhodospseudomonas spheroides*, *Biochem J*, 62, 78-93.
- Li, L., Zhang, Q. dan Huang, D., 2014. A review of imaging techniques for plant phenotyping, *Sensors (Basel)*, 14, 20078-20111.
- Lichtenthaler H. K. dan Wellburn, A. R. "Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents". *Botanisches Institut der Universitat, Kaiserstraße 12, Postfach 6380. Karlsruhe, Federal Republic of Germany, and Department of Biological Sciences, University of Lancaster, Bailrigg, Lancaster LA1 4YQ. U.K.*
- Loftus M. E. dan Carpenter, J. H., 1971. A fluorometric method for determining chlorophylls a, b and c. *Journal of Marine Research*, 29, 319-338.
- Lorenzen, C. J., 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration, *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 13, 223-227.
- Mackinney, G., 1941. Absorption of Light by Chlorophyll Solutions *Journal of Biological Chemistry*, 140, 315-322.
- Mackinney, G., dan Weast, C. A., 1940. Color changes in green vegetables, frozen-pack peas and string beans. *Ind. Eng. Chem.* 32, 392-395.
- Madgwick, J.C., 1965. Quantitative chromatography of algal chlorophylls on thin layers of glucose, *Deep. Sea Res.*, 12, 233-236.
- Madgwick, J.C., 1966. Chromatographic determination of chlorophylls in algal cultures and phytoplankton, *Deep Sea Res.*, 13, 459-466.
- Moss, B., 1967. A Note on the Estimation of Chlorophyll a in Freshwater Algal Communities *Limnology and Oceanography*, 12, 340-342.
- Moss, B., 1967. A Spectrophotometric Method for the Estimation of Percentage Degradation of Chlorophylls to Pheo-Pigments in Extracts of Algae, *Limnology and Oceanography*, 12, 335-340.
- Nagae, H., Kuki, M., Cogdell, R. J., dan Koyama, Y. 1994. Shift of the $^1A_g^- \rightarrow ^1B_u^+$ electronic absorption of carotenoids in nonpolar and polar solvents *J Chem Phys* 101:6750-6765.

- Pagola, M., Ortiz, R., Irigoyen, I., Bustince, H., Barrenechea, E., Aparicio-Tejo, P., Lamsfus, C. dan Lasa, B., 2009. New method to assess barley nitrogen nutrition status based on image colour analysis, *Computers and Electronics in Agriculture*, 65, 213-218.
- Pan, W. J., Wang, X., Deng, Y. R., Li, J. H., Chen, W., Chiang, J. Y., Yang, J. B. dan Zheng, L., 2015. Nondestructive and intuitive determination of circadian chlorophyll rhythms in soybean leaves using multispectral imaging, *Sci Rep*, 5, 11108.
- Perkins, H.J. dan Robert, D.W., 1962. Purification of chlorophylls, pheophytins and pheophorbides for specific activity determinations, *Biochim. Biophys. Acta.*, 58, 486-498.
- Perez-Patricio, M., Camas-Anzueto, J. L., Sanchez-Alegria, A., Aguilar-Gonzalez, A., Gutierrez-Miceli, F., Escobar-Gomez, E., Voisin, Y., Rios-Rojas, C. dan Grajales-Coutino, R., 2018. Optical Method for Estimating the Chlorophyll Contents in Plant Leaves, *Sensors (Basel)*, 18.
- Porra, R. J., 1990. The assay of chlorophylls a and b converted to their respective magnesium-rhodochlorin derivatives by extraction from recalcitrant algal cells with aqueous alkaline methanol: prevention of allomerization with reductants, *Biochim Biophys Acta* 1015, 493-502.
- Porra, R. J., 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b, *Photosynth Res*, 73, 149-156.
- Porra, R. J., 1991. Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic, and marine organisms, including recalcitrant algae. in *Chlorophylls*, ed. H. SCHEER, CRC Press, Boca Raton, 1991, pp. 31-57.
- Porra, R. J., 1990. A simple method for extracting chlorophylls from the recalcitrant alga, *Nannochloris atomus*, without formation of spectroscopically-different magnesium-rhodochlorin derivatives Robert, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1019, 137-141.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. dan Kriedemann, P. E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochemica et Biophysica Acta*, 975, 384-394.
- Rebeiz, C.A., Haidar, M.A., dan Yaghi, M., 1970. Porphyrin Biosynthesis in Cell-free Homogenates from Higher Plants, *Plant Physiol.*, 46(4):543-549.
- Rebeiz, C. A., Crane, J. C., Nishijima, C. dan Rebeiz, C. C., 1973. Biosynthesis and accumulation of microgram quantities of chlorophyll by developing chloroplasts in vitro, *Plant Physiol*, 51, 660-666.
- Reeves, D. W., Mask, P. L., Wood, C. W. dan Delaney, D. P., 1993. Determination of wheat nitrogen status with a hand-held chlorophyll meter: influence of management practices, *J Plant Nutr*, 16, 781-796.
- Riley, J. P. dan Wilson, T. R. S., 1965. The use of thin-layer chromatography for the separation and identification of phytoplankton pigments. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 45, 583-591.
- Riley, J. P. dan Wilson, T. R. S., 1967. The pigments of some marine phytoplankton species, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 47(2), 351-362.
- Ritchie, R. J., 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents, *Photosynth Res*, 89, 27-41.
- Richards, F. A. dan Thompson, T. G., 1952. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. Mar. Res.*, 11, 156-172.
- Richards, W.R. dan Rapoport, H., 1966. The biosynthesis of Chlorobium chlorophylls-660. The isolation and purification of porphyrins from Chlorobium thiosulfatophilum-660, *Biochemistry*, 5(3), 1079-1089.
- Robert, D.W. dan Perkins, H.J., 1962. Chlorophyll biosynthesis and turnover in wheat leaves. *Biochim Biophys Acta.*, 58, 499-506.
- Schneider, H.A.W., 1966. Eine einfache Methode zur dunnschichtchromatographischen Trennung von Plastidenpigmenten, *J. Chromatogr.*, 21, 448-453.
- Schneider, H.A.W., 1968. Chlorophyllides in green and etiolated leaves, *Phytochemistry*, 7, 885-886.
- Schulten, K. dan Karplus, M. 1972. Origin of a low-lying forbidden transition in polyenes and related molecules. *Chem Phys Lett* 14:305-309.
- Šesták, Z., 1965. Paper chromatography of chloroplast pigments (chlorophylls and carotenoids), *Chomatogr. Rev.*, 7, 65-97.

- Šesták, Z., 1966. Construction of a simple nomogram for evaluating two-wavelength spectrophotometric determination of chlorophylls, *Biologia Plantarum*, 8, 97-109.
- Šesták, Z., 1971. Determination of chlorophylls a and b. in *Plant Photosynthetic Production: Manual of Methods*, eds. Z. Šesták, J. Catsky and P. G. Jarvis, Dr. W. Junk, N.V., Publishers, The Hague, 1971, pp. 672-701.
- Seliskar, C.J., 1966. Separation of phytylated and non-phytylated chlorophylls by thin-layer chromatography, 17(1), 174-177.
- Sherma, J. dan Lippstone, G.S., 1969. Chromatography of chloroplast pigments on preformed thin layers, *J. Chromat.*, 41, 220-227.
- Sherma, J., 1971. Chromatography of leaf pigments on silica gel and aluminum hydroxide loaded papers, 61, 202-204.
- Shimadzu Cooperation,(2010-2012) High performance liquid chromatography mass spectrometer LCMS-8030 LCMS-8040 instruction manual, Shimadzu Cooperation, Kyoto.
- Shimizu, S., 1971. Separation of chloroplast pigments on Sephadex LH-20, *Journal of Chromatography A*, 59(2), 440-443.
- Smith, J. H. C. dan Benitez, A., 1995. Chlorophylls : analysis in plant materials, dalam *Moderne Methoden der Pflanzen Analyses*, Vol. 14, Peach, K. dan Tracey, M. V., Eds., Springer-Verlag, Berlin dan New York. 142.
- Smith J.H.C. dan Benitez A., 1955. Chlorophylls: Analysis in Plant Materials. In: Paech K., Tracey M.V. (eds) *Modern Methods of Plant Analysis / Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. *Modern Methods of Plant Analysis / Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, vol 4. Springer, Berlin, Heidelberg
- Stainer, R.Y. dan Smith, J.H. 1960. The chlorophylls of green bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 41, 478-484.
- Strain, H.H., 1941. Unsaturated fat oxidase: specificity, occurrence and induced oxidations. *J. Am. Chem. Soc.* 63, 3542.
- Strain, H. H., 1954. Chlorophyll Reactions, Oxidation and Isomerization Reactions of Chlorophylls in Killed Leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2, 1222-1226.
- Strain, H., 1965. Chloroplast Pigments and the Classification of Some Siphonaeal Green Algae of Australia. *Biological Bulletin*, 129(2), 366-370.
- Strain, H. H. dan Svec, W. A., 1966. Extraction, separation, estimation, and isolation of the chlorophylls , dalam *The Chlorophylls*, Vernon, L. P. Dan Seely, G.R., Eds., Academic Press, New York.
- Svensgaard, J., Roitsch, T. dan Christensen, S., 2014. Development of a Mobile Multispectral Imaging Platform for Precise Field Phenotyping, *Agronomy*, 4, 322-336.
- Sweeney, J. P. dan Martin, M., 1958. Determination of Chlorophyll and Pheophytin in Broccoli Heated by Various Procedures, *Journal of Food Science*, 23, 635-647.
- Tan, C. T. dan Francis, F. J., 1962. Effect of Processing Temperature on Pigments and Color of Spinach, *Journal of Food Science*, 27, 232-241.
- Tavan, P. dan Schulten, K. 1986. The Low-Lying Electronic Excitations in Long Polyenes - a Ppp-Mrd-Cl Study. *J Chem Phys* 85:6602-6609.
- Taylor, R. F., 1983. Chromatography of carotenoids and retinoids. In *Advances in Chromatography*, vol. 22, J. C. Giddins, E. grushka, J. Cazes, and P. R. Brown eds. Dekker, New york, pp. 157-213.
- Tswett, M., 1906. Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode: Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 24, 384-393.
- Turner, F. T. dan Jund, M. F., 1991. Chlorophyll meter to predict nitrogen topdress requirement for semi-dwarf rice, *Agron J*, 83, 926-928.
- Van Norman, R. W., 1957. Errors in spectrophotometric analyses of chlorophyll mixtures. *Proc. Utah Acad. Sci.* 34: 39-44.
- Van Niel, C.B. dan Arnold, W., 1938. The quantitative estimation of bacteriochlorophyll. *Enzymologia* 5:244-250
- Vermaas, W. F. J., Timlin, J. A., Jones, H. D. T., Sinclair, M. B., Nieman, L. T., Hamad, S. W., Melgaard, D. K. dan Haaland, D. M., 2008. In vivo hyperspectral confocal fluorescence imaging

- to determine pigmen localization and distribution in cyanobacteria cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 4050-4055.
- Vernon, L. P., 1960. Spectrophotometric Determination of Chlorophylls and Pheophytins in Plant Extracts, *Analytical Chemistry*, 32, 1144-1150.
- Virgin, H. I., 1961. Action Spectrum for the Elimination of the Lag Phase in Chlorophyll Formation in Previously Dark Grown Leaves of Wheat, *Physiologia Plantarum*, 14, 439-452.
- Virgin, H. I., 1960. Pigment Transformations in Leaves of Wheat after Irradiation, *Physiologia Plantarum*, 13, 155-174.
- Volk, S. L. dan Bishop, N. I., 1968. Photosynthetic Efficiency of a Phycocyanin-less Mutant of *Cyanidium*, *Photochemistry and Photobiology*, 8, 213-221.
- Waskom, R. M., Westfall, D. G., Spellman, D. E. dan Soltanpour, P. N., 2008. Monitoring nitrogen status of corn with a portable chlorophyll meter, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 27, 545-560.
- Weiss, C., 1972. The Pi electron structure and absorption spectra of chlorophylls in solution, *Journal of Molecular Spectroscopy*, 44, 37-80.
- White, R. C., Jones, I. D. dan Gibbs, E., 1963. Determination of Chlorophylls, Chlorophyllides, Pheophytins, and Pheophorbides in Plant Materiala, *Journal of Food Science*, 28, 431-436.
- White, R. C., Jones, I. D., Gibbs, E. dan Butler, L. S., 1972. Fluorometric estimation of chlorophylls, chlorophyllides, pheophytins, and pheophorbides in mixtures, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20, 773-778.
- Wickliff, J.L. dan Aronoff, S., 1962. Quantitative measurement of leaf chlorophylls by spectrophotometry of their pheophytins in aqueous alcoholic extracts, *Plant. Physiol*, 37(5), 584-589.
- Wintermans, J.E.G. dan De Mots, A., 1965. Spectrophotometric Characteristics of Chlorophyll a and b and Their Phaeophytins in Ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 109, 448-453.
- Wun, C. K., Rho, J. dan Walker, R. W., 1980. A solvent partitioning procedure for the separation of chlorophylls from their degradation products and carotenoid pigments, *Hydrobiologia*, 71, 289-293.
- Xiong, D., Chen, J., Yu, T., Gao, W., Ling, X., Li, Y., Peng, S. dan Huang, J., 2015. SPAD-based leaf nitrogen estimation is impacted by environmental factors and crop leaf characteristics, *Sci Rep*, 5, 13389.
- Yentsch, C.S. dan Menzel, D.W., 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep Sea Res Oceanogr Abstr* 10: 221-231.
- Zaman-Allah, M., Vergara, O., Araus, J. L., Tarekegne, A., Magorokosho, C., Zarco-Tejada, P. J., Hornero, A., Alba, A. H., Das, B., Craufurd, P., Olsen, M., Prasanna, B. M. dan Cairns, J., 2015. Unmanned aerial platform-based multi-spectral imaging for field phenotyping of maize, *Plant Methods*, 11, 35.
- Zapata, M., Jeffrey, S. W., Wright, S. W., Rodriguez, F., Garrido, J. dan Clementson, L., 2004. Photosynthetic pigments in 37 species (65 strains) of Haptophyta: implications for oceanography and chemotaxonomy, *Mar Ecol Prog Ser*, 270, 83-102.
- Zechmeister, L., 1934. Carotenoids. Springer, Berlin

Glosarium

Akurasi: tingkat kedekatan pengukuran kuantitas terhadap nilai sebenarnya.

Analit: substansi yang akan dianalisa atau subyek analisa.

Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI): metode ionisasi yang digunakan dalam spektrometri massa yang memanfaatkan reaksi ion-molekul fase-gas pada tekanan atmosfer (105 Pa) dengan bantuan unit jarum yang melepaskan korona. Penggunaan utama APCI adalah untuk senyawa stabil termal polar dan relatif kurang stabil dengan berat molekul kurang dari 1500 Da.

Collision-induced dissociation (CID): teknik spektrometri massa untuk menginduksi fragmentasi ion molekuler dalam fase gas.

Electrospray Ionisation (ESI): teknik yang digunakan dalam spektrometri massa untuk menghasilkan ion menggunakan electrospray di mana tegangan tinggi diterapkan ke cairan untuk menciptakan aerosol.

Eksitasi elektronik: proses dimana molekul tereksitasi dari keadaan elektronik rendah ke keadaan elektronik yang lebih tinggi. Proses ini dapat terjadi dengan absorpsi foton oleh suatu kromofor.

Faktor retensi: parameter yang digunakan untuk menganalisa dan membandingkan laju migrasi komponen melalui kolom.

Faktor selektivitas: parameter yang memberikan informasi terkait seberapa baik kolom akan memisahkan dua komponen A dan B.

Ion Prekursor: ion yang terdisosiasi menjadi ion fragmen yang lebih kecil, biasanya karena disosiasi yang diakibatkan tabrakan dalam percobaan multistage / mass spectrometry (MS / MS). Ion prekursor disebut pula sebagai *parent ion* atau ion asal.

Ion Produk: Ion yang terbentuk sebagai produk dari reaksi yang melibatkan ion prekursor tertentu.

Keadaan dasar: suatu keadaan yang memiliki energi paling rendah dalam sistem mekanika kuantum. Energi pada keadaan dasar dikenal sebagai energi titik nol dari sistem.

Keadaan tereksitasi: suatu keadaan dimana memiliki energi lebih tinggi dibandingkan dengan keadaan dasar.

Koefisien ekstinsi: besaran yang merefleksikan kemungkinan transisi dimana besaran tersebut telah ditentukan dari suatu transisi, dengan kata lain suatu besaran untuk mengukur kemampuan substansi dalam menyerap foton pada panjang gelombang tertentu dan pada suatu densitas massa atau konsentrasi molar tertentu.

Kromatografi: suatu teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam untuk memisahkan komponen (berupa molekul) yang berada pada larutan. Molekul yang terlarut dalam fase gerak, akan melewati kolom yang merupakan fase diam.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT): bentuk modern dari kromatografi cair yang menggunakan kolom dengan ukuran partikel kecil dimana fase gerak dialirkan dengan cara dipompa dengan tekanan tinggi.

Kromatogram: diagram plot yang menunjukkan pita-pita pemisahan komponen dengan metode kromatografi. Sumbu x dari kromatogram menunjukkan waktu retensi dalam satuan menit yang digunakan untuk mengidentifikasi secara kualitatif komponen dalam sampel, sedangkan luas area pita memberikan data kuantitatif dari komponen terdeteksi.

Kromofor: bagian dari molekul organik yang menyerap elektromagnetik pada daerah ultraviolet dan tampak.

Limit deteksi: konsentrasi terukur yang terendah

Matriks: bahan lain yang terdapat dalam sampel selain analit.

MRM: Multiple Reaction Monitoring

m/z: rasio massa-ke-muatan

Presisi: reproduktivitas atau dapat ulangnya dari mereplikasi pengukuran

Rentang dinamis linier: rentang linier dari kurva kalibrasi

Resolusi kolom (R_s): dasar kuantitatif dimana dua pita terpisah satu dengan yang lainnya dalam jarak (d) relatif terhadap lebar pita.

Saponifikasi: prosedur pemurnian untuk menghilangkan lipid yang terikat pada molekul pigmen.

Sensitivitas: kemampuan untuk membedakan antara perbedaan kecil dalam konsentrasi

Selektivitas: kemampuan untuk membedakan analit dari interferensi

Spektroskopi: ilmu yang mempelajari interaksi antara molekul atau partikel dengan radiasi elektromagnetis.

SIM: Single Ion Monitoring

TIC: Total Ion Current

Waktu retensi atau **waktu tambat (t_R):** waktu yang dibutuhkan oleh komponen A terdeteksi oleh detektor setelah injeksi sampel.

Indeks

- Akurasi, 5
 Analit, 2
 anti-ikatan (*antibonding*), 39
attenuated total reflection (ATR), 50
autosampler, 17
 batas kuantisasi, 8
 batas linearitas, 8
 bilangan gelombang, 49
 Collision-induced dissociation (CID), 30
Degasser, 19
 detektor diode array (DAD), 19
 diijinkan (*allowed*), 38
DUIS (*Dual Ion Source*), 27
 eksitasi vibrasi, 47
 Faktor retensi, 13
 Faktor selektivitas, 13
 fase diam, 10
 fase gerak, 10
 Foton, 37
 frekuensi-frekuensi fundamental, 49
highest occupied molecular orbital, HOMO, 37
 HILIC, 22
 homogenizer, 56
 hukum Beer-Lambert, 38
 Hukum Hooke, 48
 ikatan (*bonding*), 39
 ion prekursor, 31
 ion produk, 31
 ionisasi elektropray (ESI), 25
 ionisasi kimia tekanan atmosfer, 26
 ionisasi tekanan atmosfer, 25
 isoprenoid poliena, 45
 jarak tempuh, 38
 jumlah pelat teoritis, 14
 kalibrasi, 4
 kemungkinan transisi, 38
 kesalahan, 5
 kesalahan acak, 5
 kesalahan sistematis, 5
 kolom C30, 83, 85
 kolom penjaga, 18
 Kromatografi fase terbalik, 20
 kromatogram, 11
 kromofor, 37, 39
 kuadropol, 27, 28
 kurva kalibrasi, 4
 laju migrasi, 12
lowest unoccupied molecular orbital, LUMO, 37
 matriks, 2
 metode gradien, 15
 Metode isokratik, 15
MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), 32
Neutral Loss, 32
 oven kolom, 19
PEEK, 18
 pemulihan, 4
 peregangan, 48
 persamaan Lichenthaler, 80
 persamaan Linchenthaler, 72
 persiapan sampel, 3
 piston, 17
 Presisi, 5
 reagen Carr-Price, 75
 Resolusi kolom (R_s), 13
 ruang tubrukan, 30
S/N ratio, 7
sampling loop, 17
 Saponifikasi, 71
 Sensitivitas, 7
 sinar ganda (*double beam*), 41
 tekukan, 48
 teori 4-orbital Goutermann, 44
 terkuantifikasi, 37
 terlarang (*forbidden*), 38
TIC (*total ion current*), 33
 VP-ODS, 80
 waktu hampa, 12
 waktu retensi, 12
 wilayah sidik jari, 51

Penulis

Tatas Hardo Panintingjati Brotosudarmo, lahir di kota Pati, Jawa Tengah. Menyelesaikan S1 (2001) jurusan kimia dari Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga, S2 (2006) bidang kimia fisika di Ludwig Maximilian Universität München, Jerman tahun 2006, serta S3 (2010) dengan fokus bidang spektroskopi dan X-ray kristalografi protein membran di University of Glasgow, UK. Beliau kemudian bekerja sebagai *associate researcher* di Northwestern University, USA dan University of Glasgow, UK. Ketertarikannya terhadap kimia instrumentasi semenjak S2, ikut mengembangkan metode fluoresensi ultrasensitif dengan spektroskopi molekul tunggal (*single molecule spectroscopy*) untuk mendeteksi protein kompleks antena penangkap cahaya. Dr. Brotosudarmo saat ini memiliki *h-index* scopus 13 dengan sitasi sejumlah 493, serta 3 paten dan 3 hak cipta. Penghargaan yang diperoleh antara lain Marie Curie Fellowship (2007), Kavli Frontier of Science (2012), Dosen Berprestasi Kopertis 7 (2013), the 22nd Toray Science and Technology Award (2016), dan the Study UK Alumni Award (2017) dari British Council, UK. Dr. Brotosudarmo adalah anggota Akademi Ilmuwan Muda Indonesia (ALMI), Chair dari Marie Curie Alumni Association (MCAA) Southeast Asia Chapter, dan Ketua Umum Himpunan Kimia Indonesia (HKI). Saat ini Dr. Brotosudarmo adalah dosen di program studi Kimia dan direktur Pusat Unggulan Iptek Perguruan Tinggi (PUI-PT) Ma Chung Research Center for Photosynthetic Pigments (MRCPP), Universitas Ma Chung, Malang, serta *honorary associate professor* di Faculty of Science, Shizuoka University, Jepang.

Leenawaty Limantara, lahir di Teluk Betung, Lampung. Memperoleh S1(1990) bidang biologi dari Universitas Kristen Satya Wacana, Indonesia; S2 (1994) dan S3 (1998) bidang kimia dari Kwansai Gakuin University, Jepang. Kemudian melanjutkan *postdoctoral* (2001) di Departemen Biologie I, Ludwig Maximilian Universität München dengan Program Khusus Biosains, German Academic Exchange Service (DAAD) dan tahun 2004 dengan Georg Forster Fellowship, Alexander von Humboldt Foundation. Selama *postdoctoral*, ia mempelajari bakterioklorofil *a* dan derivatif sebagai sensitizer potensial untuk fotodinamika terapi tumor. Dr. Limantara memulai karirnya di institusi pendidikan tinggi sebagai dosen (1990 - 2007) dari Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana, kepala (2004 - 2007) dari Departemen Magister Biologi, Sekolah Pascasarjana, Universitas Kristen Satya Wacana, Indonesia. Dr Limantara berhasil mendirikan dan mengembangkan kelompok penelitiannya di Ma Chung Research Center for Photosynthetic Pigments (MRCPP), Universitas Ma Chung. Dia bekerja pada pigmen fotosintetik dan aplikasinya untuk makanan fungsional dan kesehatan. Beberapa penghargaan bergengsi yang didapatkannya antara lain Juara 1 Dosen Berprestasi (2004) di Provinsi Jawa Tengah, Juara 2 Nasional Dosen Berprestasi (2004), Toray Sains dan Teknologi Award (2005), dan Humboldt Penghargaan Alumni (2018) dari Alexander von Humboldt Foundation, Jerman.

Heriyanto, lahir di Salatiga, Jawa Tengah. Menyelesaikan S1 di Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika (FSM), Universitas Kristen Satya Wacana (UKSW), Salatiga pada tahun 2004. Pada tahun 2006-2009 mengikuti pendidikan *double degree* di Magister Biologi, UKSW, Salatiga dan di Chemistry Department, Graduated School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University (KGU), Jepang. Ibu Leenawaty Limantara, Ph.D. memperkenalkan kepada penulis mengenai analisa pigmen menggunakan spektrofotometer UV-Tampak dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) ketika menempuh studi S1 dan S2 di UKSW. Spektroskopi FT-IR dan NIR digunakan dalam studi interaksi antar molekul dibawah supervisi Prof. Yukihiro Ozaki dan Dr. Akifumi Ikehata di KGU, Jepang. Saat ini penulis sedang menempuh pendidikan S3 di Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Polandia dengan topik “the effects of molecular asymmetry on carotenoids in solution and in model LH1 complex”. Heriyanto mengajar Praktikum Kimia Instrumentasi dan Kimia Pigmen sebagai dosen di Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ma Chung serta sebagai peneliti di Ma Chung Research Center for Photosynthetic Pigments (MRCPP), Universitas Ma Chung.

Rekomendasi

Buku ini sangat baik bagi para pemula yang baru memasuki dunia analisa kimia dan untuk mereka yang ingin terus dapat mengikuti perkembangan dunia analisa terutama analisa pigmen. Penjelasan tentang instrumentasi diberikan dengan sangat jelas dan mudah dipahami serta dilengkapi dengan beberapa pertanyaan yang diberikan disetiap akhir bab sehingga bisa membantu mereview pemahaman dari setiap bagian yang kita baca. Proses atau tahapan preparasi sampel disajikan dengan rinci sehingga mudah untuk diikuti. Referensi yang baik untuk kita yang berkecimpung di dunia analisa kimia. (*Dra. Asri MN Wulan, Manager Application & Marketing Support Dept., PT Ditek Jaya*).

Kimia Analitik Instrumentasi merupakan mata kuliah untuk menguasai kompetensi instrumentasi guna menganalisis kandungan senyawa-senyawa kimia dalam bahan uji secara kualitatif dan kuantitatif. Pigmen fotosintesis menjadi objek dan sistem pembelajaran yang ideal bagi mahasiswa tingkat sarjana strata satu untuk menguasai analisis kimia secara holistik dan aplikatif. Penggunaan pigmen fotosintesis sebagai objek pembelajaran dapat mengembangkan kemampuan berfikir analitik yang holistik dari mahasiswa secara signifikan.

Mahasiswa dapat menerapkan prinsip analitik yang nyata pada senyawa-senyawa organik khususnya senyawa bahan alam. Hadirnya buku ***Kimia Analitik Instrumentasi*** diharapkan dapat digunakan untuk melengkapi literatur mahasiswa Program Studi (Prodi) Kimia ataupun prodi dari fakultas lain, seperti Pangan dan Teknologi Pangan, Pertanian, Farmasi, Teknik Kimia, bahkan Kedokteran.

Sebagai tambahan, hasil karya praktikum mahasiswa juga disertakan dengan maksud agar pengguna buku memiliki kepercayaan diri dalam mencoba dan melakukan eksperimen yang terdapat pada buku ini, guna mengembangkan keterampilan diri untuk sampel-sampel yang lebih sulit. Selain itu, di bagian akhir setiap bab, buku ini juga menyertakan latihan soal untuk menguji kedalaman materi yang telah dipelajari.

Materi yang dibahas dalam buku ini mencakup:

BAB 1 Pendahuluan

BAB 2 Dasar Separasi Analitik dengan Kromatografi

BAB 3 Kromatografi Cair-Spektrometri Massa

BAB 4 Spektroskopi

BAB 5 Metode Analitik Klorofil

BAB 6 Metode Analitik Karotenoid

BAB 7 Proyek Mini Mahasiswa



**Penerbit
Salemba Teknika**

salemba
practice



ISBN: 978-979-9549-50-1



9 789799 549501

www.elearning.penerbitsalemba.com