

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pestisida

Pestisida didefinisikan sebagai zat yang ditujukan untuk mencegah, menghancurkan, dan mengendalikan hama termasuk spesies yang tidak diinginkan dari tanaman atau hewan selama produksi, penyimpanan, transportasi, distribusi dan pengolahan. Sedangkan residu pestisida adalah zat tertentu dalam makanan, komoditas pertanian atau pakan ternak yang dihasilkan dari penggunaan pestisida. Istilah ini mencakup derivatif apapun dari pestisida, seperti produk konversi, metabolit, produk reaksi dan kotoran dianggap toksik (WHO, 2004).

Pestisida (herbisida, fungisida, insektisida atau akarisida) memiliki peran penting dalam pembangunan pertanian, penjamin peningkatan produksi pertanian. Hal ini menyebabkan penggunaan pestisida meningkat secara signifikan dalam beberapa dekade terakhir. Penggunaan senyawa kimia tersebut berpengaruh terhadap kontaminasi tanah, air dan makanan, yang menyebabkan akumulasi kontaminan ke lingkungan yang dapat masuk ke dalam rantai makanan manusia (Tette *et al.*, 2016).

Menurut Llorent-Martínez *et al.*, lebih dari 98 % dari insektisida dan 95 % dari herbisida yang disemprotkan tidak mencapai tujuan akhir mereka, yang merupakan spesies sasaran. Pestisida sering ditemukan dalam air, tanah, atmosfer dan produk pertanian dan menjadi ancaman bagi lingkungan. Bahkan pada konsentrasi rendah, kontaminan dapat menyebabkan efek buruk untuk manusia,

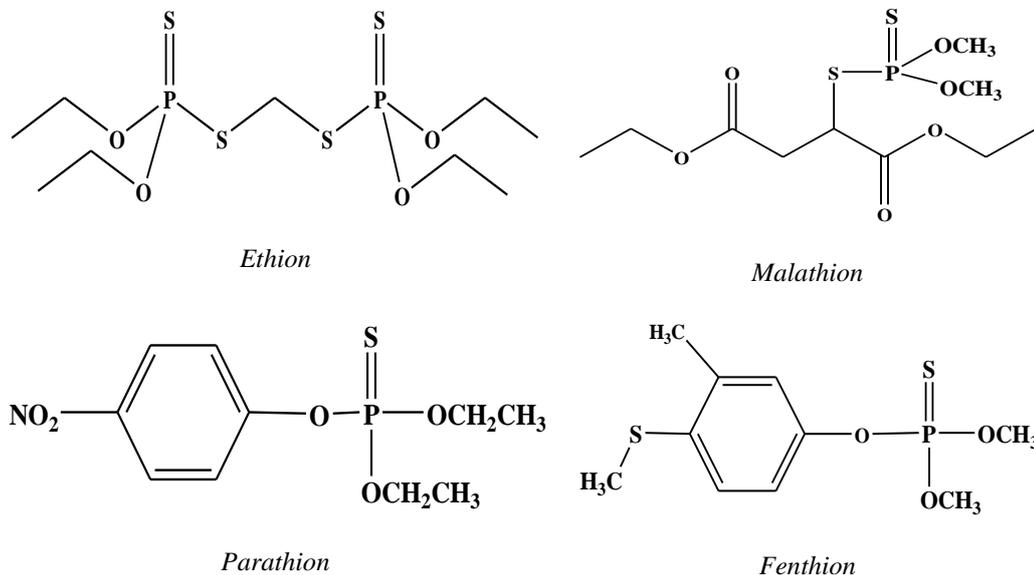
tanaman, hewan dan juga untuk ekosistem karena beberapa dari mereka adalah karsinogenik, dan lain-lain dapat menyebabkan disfungsi dalam sistem saraf. Oleh karena itu, kehadiran pestisida dalam makanan dan lingkungan telah menjadi masalah kesehatan yang serius di seluruh dunia (Tette *et al.*, 2016).

Tanah adalah matriks kompleks yang terdiri dari bahan organik maupun anorganik. Tanah memiliki banyak situs aktif (polar, nonpolar dan ionik) yang mampu mempertahankan pestisida dan residu lainnya. Dibandingkan dengan matriks lainnya yang biasa digunakan dalam analisis residu pestisida (misalnya buah-buahan dan sayuran), sampel tanah yang lebih sulit untuk diekstrak dan memerlukan waktu ekstraksi yang lama karena interaksi yang kuat yang terjadi antara tanah dan pestisida (UCT, 2014). Kondisi residu pestisida dalam tanah sangat bervariasi dan dikontrol oleh perubahan kimia, biologi dan fisika dari matriksnya. Residu pestisida akan hancur dalam beberapa hari oleh beberapa mikroorganisme tanah atau tetap terakumulasi selama bertahun-tahun, tergantung pada suhu dan praktek penggunaan pestisida itu sendiri oleh petani (Andreu & Pico, 2004).

2.1.1 Organofosfat

Senyawa organofosfat merupakan golongan insektisida yang cukup besar penggunaannya. Golongan ini sering disebut *organic phosphates*, *phosphorus insectisida*, *phosphates*, *phosphorus esters* atau *phosphoric acid esters*. Contoh pestisida jenis ini adalah, malation, monokrotofos, paration, fofamidon, dimetoat dan klorofos dengan struktur terlihat pada Gambar 2.1. Senyawa ini tidak stabil, karena itu dari segi lingkungan senyawa ini lebih baik daripada organoklorin. Namun senyawa ini lebih toksik terhadap hewan bertulang belakang, tidak stabil dan nonpresisten, sehingga golongan ini dapat menggantikan organoklorin,

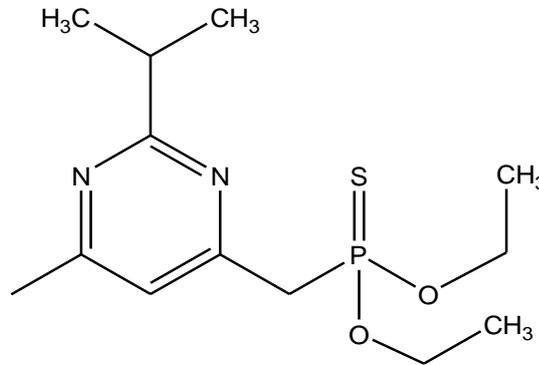
khususnya untuk menggantikan DDT. Sistem kerjanya menghambat fungsi kerja enzim aetil kolin esterase dan mempengaruhi sitem saraf. Tanda-tanda keracunan organofosfat pada hewan mamalia adalah otot kejang, bergetar dan mata keriput. Pekerja yang bersentuhan langsung dengan senyawa organofosfat mudah letih, tidak bertenaga, insomia, dan mudah lupa. Gejala lainnya adalah penglihatan kabur, pusing, mual, sukar bernapas, lumpuh dan pingsan (Subaktyo Sudarmo, 1991). Organofosfat adalah insektisida yang paling toksik diantara jenis pestisida lainnya dan menyebabkan keracunan pada manusia.



Gambar 2.1 Struktur Senyawa Pestisida Organofosfat

Diazinon merupakan insektisida organofosfat dengan bobot molekul 304,35 g/mol, dengan titik didih 83 – 94 °C, tekanan uap $4,6 \times 10^{-5}$ mmHg pada suhu 10 °C, $1,4 \times 10^{-4}$ mmHg pada suhu 20 °C, dan $1,1 \times 10^{-3}$ mmHg pada suhu 40 °C, kelarutan dalam air 0,004% pada suhu 20 °C dan larut dalam pelarut organik. Struktur diazinon dengan nama kimianya O,O-dietil-O-(2-isopropil-6-metil-4-4-pirimidil)

fosforotioat, dapat dilihat pada Gambar 2.2. Diazinon menyerap sinar UV pada panjang gelombang 247 nm (Hartanti *et al.*, 2012)



Gambar 2.2. Struktur Diazinon

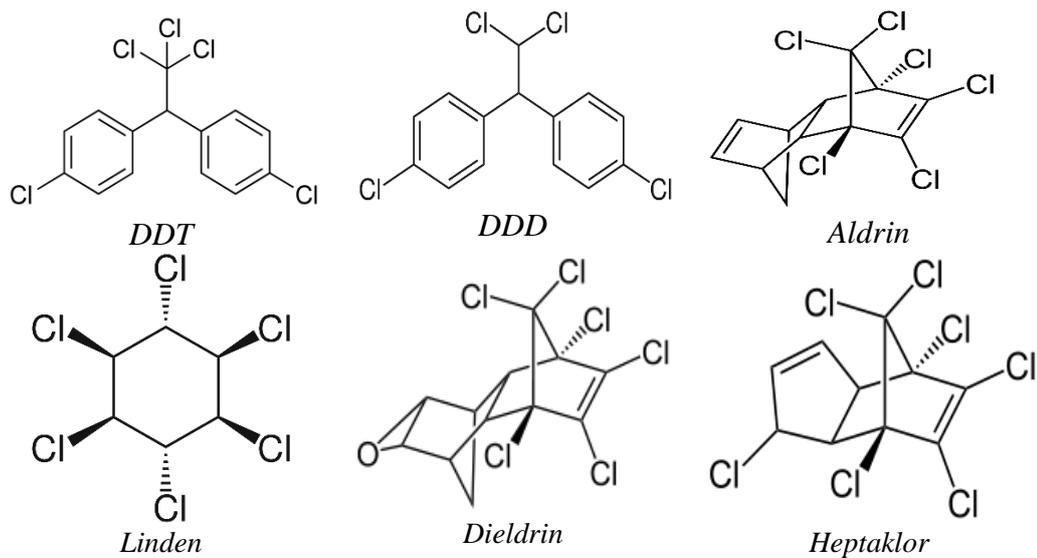
Diazinon digunakan untuk mengendalikan kutu daun, lalat buah, dan kutu loncat pada buah apel, anggur, dan per. Batas maksimum residu yang diperbolehkan di Indonesia pada buah apel, anggur dan pir sebesar 0,5 mg/kg (Syahbirini dan Pumama, 2001).

2.1.2 Organoklorin

Golongan insektisida ini terdiri atas karbon, klorin dan hidrogen. Golongan ini sering disebut hidrokarbon terklorinasi, organik terklorinasi, insektisida terklorinasi atau insektisida terklorinasi. Contoh organoklorin adalah DDT, DDD, aldrin, dieldrin, lindan, dan heptaklor dengan struktur seperti yang terlihat pada Gambar 2.3. Pengaruh fisiologis organoklorin adalah pada susunan syaraf pusat, senyawa ini berakumulasi pada jaringan lemak. Mempunyai efek residu yang panjang, menumpuk dalam rantai makanan, sehingga sangat berbahaya bagi kehidupan binatang dan manusia.

Salah satu kelas yang tergolong dalam pestisida organoklorin adalah antranilik diamida mengikat reseptor ryanodine dengan potensi selektif terhadap

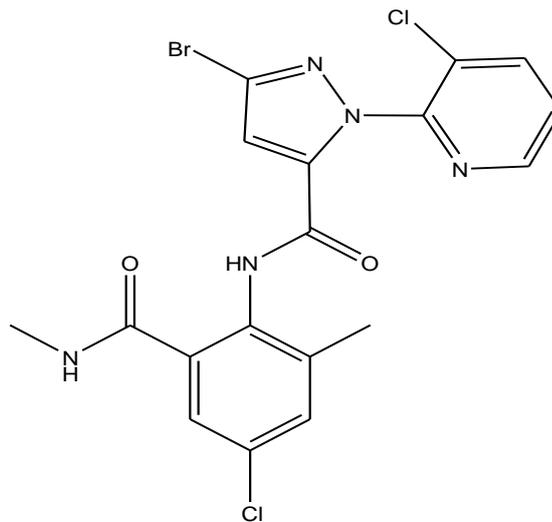
reseptor serangga dan mamalia. Produk antranilik diamida yang pertama adalah klorantraniliprol, memiliki aktivitas yang luar biasa melawan hama lepidopteran. Yang kedua, *cyantraniliprole*, memiliki aktivitas *cross-spectrum* yang sangat baik terhadap berbagai macam serangga, termasuk hama *lepidopteran* dan *hemipteran* (Selby et al., 2016).



Gambar 2.3. Struktur Senyawa Pestsida Organoklorin

Klorantraniliprol dengan modus aksi baru yang disebut “*Ryanodine Receptors Activators*” (Cordova et al., 2006; Lahm et al., 2005) bersifat racun perut dan racun kontak. Cara kerja klorantraniliprol adalah dengan mengganggu saraf otot dengan mengaktifkan reseptor rianodin serangga yang menyebabkan berkurangnya ion kalsium intraselular sehingga mengakibatkan kelumpuhan otot dan kematian pada serangga. Gejala yang ditunjukkan oleh serangga akibat aplikasi insektisida klorantraniliprol adalah paralisis, berhenti makan dan dalam beberapa hari dapat menyebabkan kematian (Cordova et al., 2006). Klorantraniliprol dengan nama kimia 3-bromo-*N*-[4-chloro-2-methyl-6-[(methyl amino) carboryl] phenyl]-1-(3-chloro-2-pyridynil)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide yang strukturnya ditunjukkan

pada Gambar 2.4. Klorantraniliprol menyerap sinar UV pada panjang gelombang 260 nm (Xu *et al.*, 2010). Batas maksimum residu pestisida klorantraniliprol 1.0 mg kg⁻¹ untuk brokoli (European Union), 0.3 mg kg⁻¹ untuk tomat (European Union), 0,3 mgKg⁻¹ untuk pear (Kanada), 0.05 mgKg⁻¹ untuk beras (Jepang), dan 0,04 mgKg⁻¹ untuk jagung (United States) (Xu *et al.*, 2010)

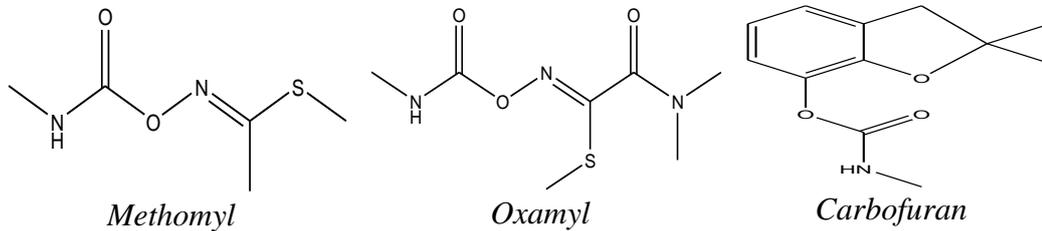


Gambar 2.4. Struktur Klorantraniliprol

2.1.3 Karbamat

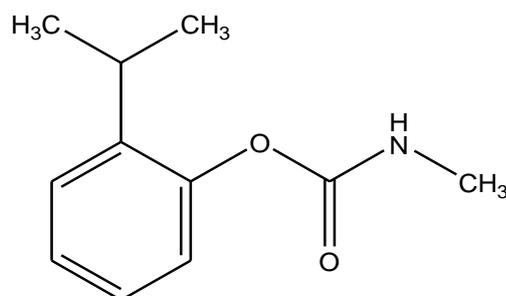
Pestisida karbamat memegang peranan penting dalam mengendalikan hama karena efisiensinya yang tinggi sebagai insektisida dan nematisida, namun kemampuan bioakumulasi rendah dan tingkat keracunan yang rendah pada mamalia. Salah satu jenis residu pestisida yang dihasilkan oleh penggunaan pestisida karbamat adalah karbaril. Karbaril (*1-naftil N-methylcarbamate*) adalah insektisida banyak digunakan dalam pertanian untuk memerangi sejumlah besar hama di berbagai macam tanaman karena efektivitasnya dan toksisitas akut rendah pada mamalia. Selain itu, karbaryl adalah salah satu residu pestisida yang paling sering terdeteksi dalam analisis makanan di seluruh dunia (Abad *et al.*, 2001). *Methomyl*, *oxamyl*, *aldicarb* dan *carbofuran* bersifat sistemik dan dapat digunakan

sebagai nematisida dengan struktur yang terlihat pada Gambar 2.5. Contoh lain yang termasuk karbamat adalah *propoxur* dan *bendiocarb*.



Gambar 2.5. Struktur Senyawa Pestsida Karbamat

Karakteristik pestisida karbamat yaitu polaritas tinggi dan larut dalam air. Namun demikian, analisis langsung menggunakan kromatografi gas (GC) memiliki kekurangan karena komponennya akan dengan cepat terdekomposisi menjadi fenol dan amina selama proses analisis. Bila memperhatikan sifat karbamat kromatografi cair (LC) digunakan untuk analisis rutin (Sun & Lee, 2003). Struktur karbamat dapat dilihat pada Gambar 2.6. Karbamat menyerap sinar UV pada panjang gelombang 220 nm (Gou *et al.*, 2000).



Gambar 2.6. Struktur Karbamat

2.2 Metode Ekstraksi *Ultrasonic Solvent Extraction (USE)*

Persiapan sampel harus cepat, sederhana, murah, ramah lingkungan dan memberikan ekstrak yang bersih. Analisis pestisida secara tradisional di tanah dilakukan dengan ekstraksi Soxhlet. Kelemahan metode ini adalah prosedurnya yang lama dan penggunaan pelarut dalam jumlah besar. Metode yang lebih ramah

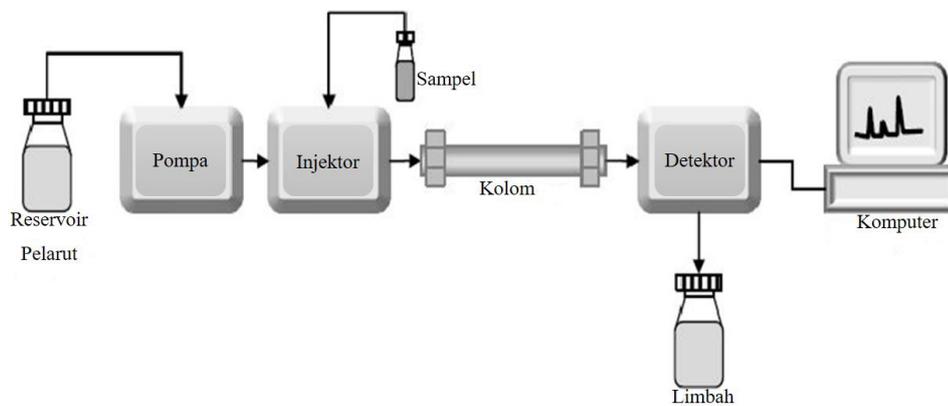
lingkungan antara lain *ultrasonic solvent extraction* (USE), *pressurised liquid extraction* (PLE), *shake-flask extraction*, *microwave assisted extraction* (MAE) atau *supercritical fluid extraction* (SFE), diikuti dengan *clean up* menggunakan *solid phase extraction* (SPE) atau *solid phase microextraction* (SPME) (Lesueur *et al.*, 2008).

Strategi baru yang lebih ramah lingkungan dengan keunggulan seperti kecepatan, otomatisasi, selektivitas dan rendahnya konsumsi pelarut. Salah satunya adalah *ultrasonic solvent extraction* (USE) yang mengekstraksi kontaminan dari sampel padat. USE meningkatkan efisiensi ekstraksi, namun setelah memperhatikan selektivitasnya yang rendah maka proses dilanjutkan dengan *clean up* untuk memperoleh ekstrak yang bersih. Pada umumnya, USE dioperasikan dengan *ultrasonic bath*. Pada tahun-tahun terakhir, menggunakan perangkat *horn type* dilengkapi dengan ujung titanium yang digunakan untuk ekstraksi senyawa organik nonvolatil dan semivolatil dari padatan seperti tanah, lumpur, dan limbah. Pada masa kini, sebuah sistem yang lebih efisien menggunakan probe ultrasonik silinder untuk sonikasi sampel tanah telah dikembangkan, dijelaskan dan diterapkan pada dispersi tanah (Lesueur *et al.*, 2008).

2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi adalah suatu metode yang memisahkan komponen campuran pada kolom adsorbent dalam sistem alir (Weston, 1997). Jenis molekul dalam sampel yang akan dipisahkan terdiri dari analit dan matriks. Dalam pemisahan kromatografi, sampel dimasukkan dalam fase gerak yang mengalir melewati fase diam (Moldoveanu and David, 2013).

Semua teknik kromatografi menggunakan fase gerak berupa cairan, dan mungkin kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) adalah yang paling dikenal. KCKT digunakan untuk analisis beberapa senyawa yang termolabil atau sangat polar dan juga pada senyawa dengan berat molekul yang tinggi. Keberhasilan suatu analisis juga sangat dipengaruhi oleh ketepatan peneliti dalam memilih dan menggunakan kolom dan komposisi eluen untuk mendapatkan nilai selektivitas yang besar sehingga interaksi antara analit, fase diam dan fase gerak dapat maksimal (Rouessac and Rouessac, 2007).



Gambar 2.7. Skema Instrumen KCKT

Pada saat analisis, sampel cair maupun padat dilarutkan dengan pelarut yang sesuai kemudian dialirkan pada kolom kromatografi dengan fase gerak cair dengan bantuan pompa untuk mengalirkan sampel maupun pelarut yang kemudian melewati kolom yang merupakan tempat terjadinya pemisahan. Hasil pemisahan akan terdeteksi oleh detektor dalam bentuk kromatogram yang mana menampilkan hubungan intensitas dan waktu retensi senyawa, seperti pada Gambar 2.7. Pemisahan ditentukan dari interaksi analit dengan fase diam (termasuk adsorpsi padat-cair, partisi cair-cair, pertuaran ion dan *size exclusion*) dan interaksi analit dengan fase gerak (Rouessac and Rouessac, 2007).

2.3.1 Instrument KCKT

Pada instrument KCKT terdapat empat bagian penting yaitu kolom, pompa, *loop* sampel dan detektor. Instrumentasi KCKT yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8. Instrumen KCKT

2.3.1.1 Reservoir pelarut

Analisis KCKT dimulai dengan *degassing* untuk menghilangkan gas-gas yang terlarut, N_2 , O_2 , dan debu yang sering menyebabkan pembentukan gelembung gas saat fase gerak memasuki detector yang menyebabkan distorsi sinyal detektor. *Degassing* dapat dilakukan dengan beberapa cara yang paling umum adalah penggunaan pompa vakum atau *sparging* dengan gas inert seperti He yang memiliki kelarutan rendah dalam fase gerak. Bahan partikulat yang dapat menyumbat pipa KCKT atau kolom dihilangkan melalui penyaringan. Fase gerak dialirkan dengan bantuan pompa.

2.3.1.2 Pompa

Pompa digunakan untuk mengalirkan pelarut dengan laju alir yang konstan melewati injektor, kolom dan detektor. Pompa harus memiliki kemampuan untuk menghasilkan tekan yang tinggi dengan tujuan utama untuk menghasilkan daya tahan dari kolom. Instrument KCKT menggunakan pompa *reciprocating* dan

pompa *syringe*. Namun kebanyakan menggunakan pompa *reciprocating* yang terdiri dari piston yang mampu menjaga aliran tetap konstan dan tekanan tinggi untuk mendorong fase gerak melalui kolom kromatografi. Katup proporsi digunakan untuk mengendalikan komposisi fase gerak yang memungkinkan perubahan komposisi fase gerak ketika menggunakan elusi gradient. Sedangkan pompa *syringe* memberikan aliran yang tidak berdenyut, tetapi reservoirnya terbatas.

2.3.1.3 Injektor

Sampel dimasukkan menggunakan *loop* injektor. *Loop* sampel tersedia dengan volume mulai dari 0,5 uL ke 2 mL. Dalam injektor KCKT terdapat posisi *load* dan posisi *inject*. Dalam posisi *load loop* sampel diisolasi dari fase gerak dan terbuka ke atmosfer. Sebuah *syringe* digunakan untuk menempatkan sampel dalam *loop*. Setiap kelebihan sampel yang tidak dibutuhkan akan keluar dari sampel *loop* melalui jalur limbah. Setelah loading sampel, injektor dirubah ke posisi *inject*. Dalam posisi ini fase gerak diarahkan melalui *loop* sampel dan masuk ke kolom.

2.3.1.4 Kolom KCKT

Kolom merupakan komponen utama pada pemisahan KCKT, dan kemampuan pemisahan merupakan hal penting dalam menentukan keberhasilan analisis. Karakteristik kolom ditentukan oleh: (1) sifat dari fase diam aktif antara lain *reversed phase* (RP), ion exchange chromatography (IEC), size exclusion chromatography (SEC), bioafinitas), (2) jenis fase (partikel berpori, monolit), (3) sifat fisik partikel (dimensi, porositas, kekuatan), (4) dimensi kolom (panjang dan diameter), (5) Kontruksi mekanik (kolom, cartridge, kompresibel kolom). Pada dasarnya kolom dipilih sesuai dengan jenis pemisahan yang dipilih, ketersediaan

peralatan, persyaratan analisis, dan informasi eksternal yang tersedia. Pemilihan kolom memiliki pengaruh yang signifikan dalam pemisahan yang diinginkan (Moldoveanu and David, 2013).

KCKT fase terbalik adalah teknik KCKT yang paling umum, dan komponen senyawa dalam jumlah besar dapat dipisahkan menggunakan RP-KCKT. Fase diamnya adalah nonpolar sedangkan fase geraknya adalah polar. Contoh fase diam adalah C-18, yang memiliki karakter hidrofobik tinggi. Hidrofobitas fase terikat bervariasi tergantung pada sifat dari substituen tersebut. Fase gerak RP-KCKT merupakan campuran pelarut organik (asetonitril, metanol, isopropanol) dan air. Fase diam KCKT tergantung pada kontak luas permukaan antar bagian nonpolar dari molekul analit dan fase diam. Pemisahan RP-KCKT berdasarkan pada partisi analit antar fase diam dan fase gerak (Moldoveanu and David, 2013).

2.3.1.5 Detektor

Pada KCKT, fase gerak yang melewati detektor mempunyai kemampuan untuk menunjukkan pengukuran. Deteksi didasarkan pada sifat fisikokimia molekul sampel yang berbeda dari fase gerak. Deteksi spesies molekular yang terelusi dari kolom dapat dilakukan menggunakan beberapa teknik. Diantaranya adalah 1) UV-Vis, 2) *Fluorescence*, 3) *refractive index (RI)*, 4) *chemiluminisence*, 5) *elektrochemical detection*, 6) *mass spectrometry (MS)*, 7) *evaporative light scattering (ELS)* (Moldoveanu and David, 2013).

Detektor KCKT paling populer didasarkan pada pengukuran spektroskopi, termasuk penyerapan UV/Vis. Bila menggunakan detektor UV/Vis, kromatogram yang dihasilkan adalah plot dari absorbansi sebagai fungsi waktu elusi. Satu kekurangan menggunakan absorbansi adalah bahwa fase gerak tidak harus

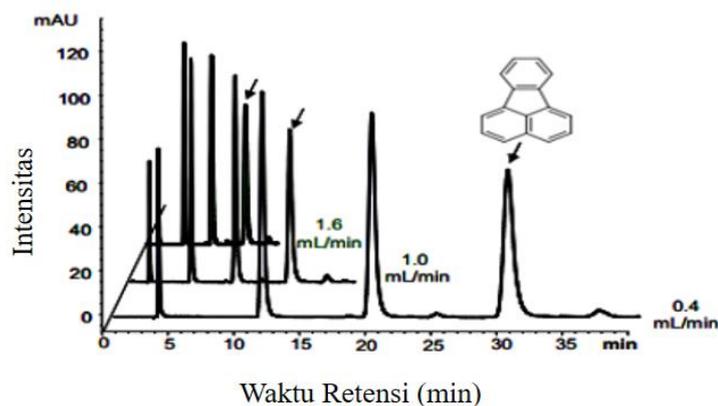
menyerap kuat pada panjang gelombang yang dipilih. Detektor berdasarkan absorbansi memberikan batas deteksi sesedikit 100 pg - 1 ng (Moldoveanu and David, 2013).

2.3.2 Parameter Kromatografi

2.3.2.1 Laju alir

Laju alir menunjukkan seberapa cepat fase gerak bergerak melalui kolom dan juga berguna untuk perhitungan konsumsi fase gerak dalam interval waktu tertentu. Laju alir dikendalikan oleh pompa dan dapat dengan mudah diatur. Laju alir tergantung pada porositas kolom. Pada prosedur KCKT biasanya dipilih antara 0,3 sampai 3 mL/menit (Moldoveanu and David, 2013).

Bila memperhatikan pengaruh laju alir terhadap pemisahan, semakin lambat laju alir maka waktu retensi senyawa akan semakin lama, dan semakin cepat laju alir maka waktu retensi senyawa yang dianalisis semakin cepat seperti yang terlihat pada gambar 2.9.

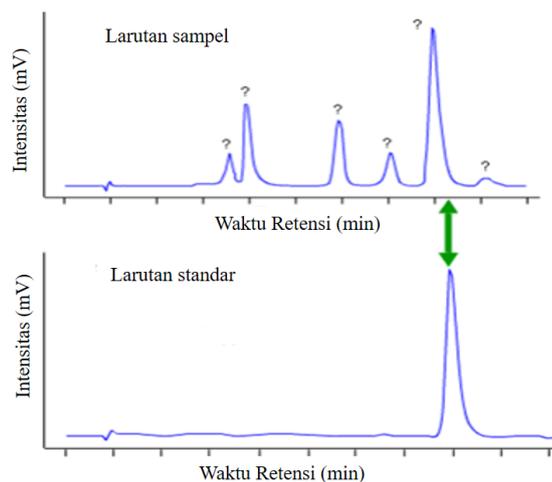


Gambar 2.9. Pengaruh Laju Alir terhadap Pemisahan

2.3.2.2 Waktu Retensi (t_R)

Waktu retensi didefinisikan sebagai waktu dari injeksi sampel untuk elusi senyawa dari kolom dan waktu retensi dari puncak terakhir di kromatogram yang

digunakan untuk memperkirakan lama waktu pemisahan, diambil dari puncak maksimum yang dimiliki oleh spesies molekul tertentu. Waktu retensi tidak hanya bergantung pada struktur molekul tertentu, tetapi juga pada faktor-faktor seperti sifat dari fase gerak dan fase diam, laju alir fase gerak dan dimensi kolom kromatografi. Waktu retensi merupakan karakteristik untuk senyawa tertentu dalam pemisahan dan sangat penting dalam mengidentifikasi analit (misalnya, dengan menggunakan standar) (Moldoveanu & David, 2013). Dalam penentuan waktu retensi senyawa yang dianalisis dapat dilakukan dengan membandingkan waktu retensi standar dengan waktu retensi sampel seperti pada Gambar 2.10.



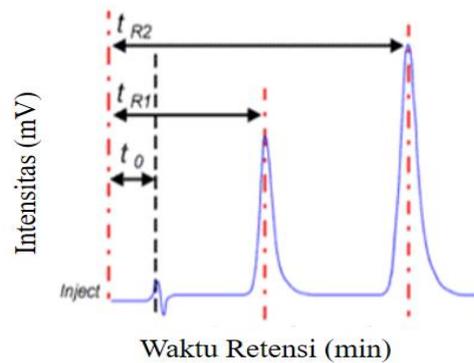
Gambar 2.10. Identifikasi Waktu Retensi

Pada Gambar 2.10 jika waktu retensi sampel sama dengan waktu retensi standar maka dapat dipastikan bahwa dalam sampel terdapat senyawa yang di analisis.

2.3.2.3 Selektivitas (α)

Selektivitas (α) dapat dihitung dari kromatogram yang dihasilkan. Nilai α dihitung menggunakan persamaan 2.1 dan Gambar 2.11.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (2.1)$$

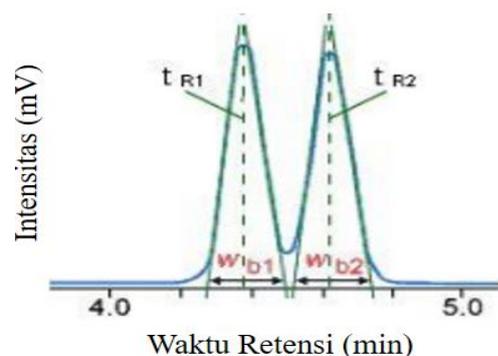


Gambar 2.11. Penentuan Selektivitas (α)

Dalam beberapa pemisahan kromatografi, nilai α yang lebih besar diperlukan untuk pemisahan lebih baik. Namun demikian, nilai α sendiri tidak menjelaskan seberapa bagus pemisahan dua komponen. Bahkan ketika α besar, puncaknya menjadi lebar dan besar sehingga pemisahan menjadi jelek. Nilai untuk α tidak hanya bergantung pada zat terlarut, tapi juga tergantung pada fase diam dan fase gerak. Untuk alasan ini, pemilihan kolom kromatografi sering didasarkan pada selektivitasnya (α) kearah analit yang dipisahkan. Untuk pemisahan yang baik nilai $\alpha > 1,2$ (Moldoveanu & David, 2013).

2.3.2.4 Resolusi (Rs)

Dalam KCKT untuk mendapatkan resolusi optimal dalam waktu yang minimum merupakan hal yang penting untuk dilakukan. Faktor resolusi dapat dilihat pada Gambar 2.12 (Harvey, 2000).



Gambar 2.12. Faktor Resolusi (Rs)

Resolusi dapat dihitung dengan menggunakan persamaan dibawah ini:

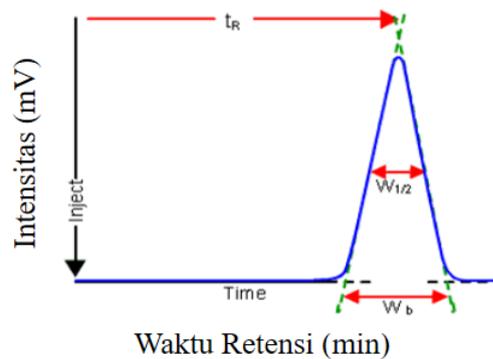
$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_{b1} - W_{b2})/2} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b1} + W_{b2})} \quad (2.2)$$

Dimana t_{R2} merupakan waktu yang diperlukan analit ketika mulai diinjeksikan sampai keluar dari kolom dengan urutan kedua (puncak kedua) dan t_{R1} pada urutan pertama (puncak pertama). Sedangkan W_{b1} merupakan luas puncak pertama dan merupakan luas puncak kedua W_{b2} (Harvey, 2000). Nilai resolusi 1,5 menunjukkan bahwa antara dua puncak komponen sampel dapat terpisah dengan baik.

2.3.2.5 Jumlah Plat Teoritis (N)

Jumlah plat teoritis (N) menunjukkan efisiensi dari kolom yang digunakan. Setiap plat merupakan jarak komponen sampel mencapai suatu kesetimbangan antara fase diam dan fase gerak. Semakin banyak kesetimbangan, maka jumlah plat teoritis akan semakin banyak, dan kualitas pemisahan semakin baik (Harvey, 2000). Untuk menghitung jumlah plat teoritis (N) digunakan persamaan 2.3 dan Gambar 2.13.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad (2.3)$$

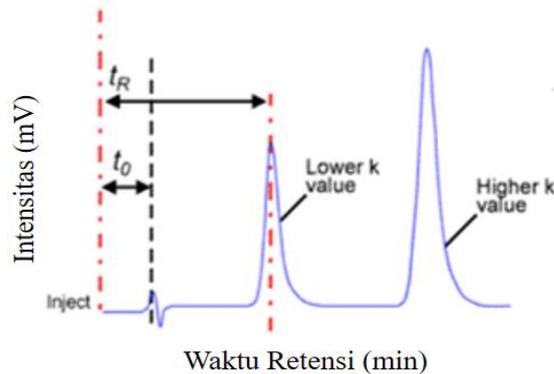


Gambar 2.13. Penentuan Jumlah Plat Teoritis (N)

2.3.2.6 Faktor Kapasitas (k')

Faktor kapasitas digunakan untuk mengukur waktu retensi analit pada kolom kromatografi (Harvey, 2000). Untuk mengukur faktor kapasitas menggunakan persamaan 2.4 dan Gambar 2.14.

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (2.4)$$



Gambar 2.14. Penentuan Faktor Kapasitas (k')

Nilai k' yang tinggi menunjukkan bahwa sampel yang ditahan telah menghabiskan banyak waktu untuk berinteraksi dengan fase diam. Nilai k' optimum berada pada rentang 1-10 yang menunjukkan bahwa waktu interaksi sampel dengan kolom adalah maksimum. Cara untuk menentukan t_0 (*void volume*) yaitu waktu gangguan awal terlihat (puncak kaget), yang disebabkan karena perbedaan absorbansi atau indeks bias pelarut yang diinjeksikan ketika melalui detektor (Harvey, 2000).

2.3.3 Teknik Elusi

2.3.3.1 Elusi Isokratik

Metode elusi isokratik merupakan metode elusi dimana komponen fase gerak tidak berubah selama proses analisis. Beberapa masalah yang berhubungan dengan metode elusi isokratik antara lain (Harvey, 2000):

- a. Analit dengan polaritas tinggi sulit untuk dapat ditahan dalam kolom dan resolusi antar puncak kromatogram sangat kecil ($<1,5$).
- b. Komponen analit yang bersifat hidrofobik akan menunjukkan waktu retensi yang lama, sehingga nilai k' tidak optimum atau >10 .
- c. Beberapa komponen akan ireversibel terabsorpsi pada kolom dan menyebabkan kolom terkontaminasi.

2.3.3.2 Elusi Gradien

Metode elusi gradien merupakan metode dengan fase gerak yang berubah selama proses analisis berlangsung. Dilakukan dengan meningkatkan jumlah pelarut organik. Gradien KCKT memungkinkan perubahan polaritas dan atau dalam pH fase gerak selama pemisahan dan secara signifikan meningkatkan fleksibilitas dari KCKT (Harvey, 2000).

Komposisi awal yang dipilih merupakan komposisi yang dapat mempertahankan analit lebih lama dalam kolom, sehingga dapat menghindari adanya puncak yang keluar pada daerah *void volume* (t_0). Kekuatan elusi kemudian ditingkatkan dengan cara yang telah ditentukan untuk mengelusi senyawa analit dengan resolusi optimum. Komposisi fase gerak akhir dipilih untuk memastikan bahwa semua senyawa dapat terelusi dari kolom dengan waktu retensi yang sesuai, dan dapat sekaligus mencuci kolom dari pengotor (Harvey, 2000). Namun, ketika waktu retensi beberapa zat terlarut menjadi terlalu lama, perubahan komposisi pelarut diperlukan untuk mempercepat pemisahan (Moldoveanu & David, 2013).

2.4 Prinsip Analisis KCKT

2.4.1 Analisis Kualitatif

Untuk analisis kualitatif KCKT dapat dilakukan dengan mengidentifikasi puncak berdasarkan waktu retensi standar. Penetapan puncak kromatogram suatu larutan sampel adalah dengan menginjeksikan larutan standar pada kondisi pemisahan yang sama. Kemudian waktu retensi larutan standar dibandingkan dengan waktu retensi larutan sampel yang dapat dilihat pada Gambar 2.10 (Harvey, 2000).

Analisis kualitatif juga dapat dilakukan dengan metode *spiking*. Metode ini dilakukan dengan cara penambahan larutan standar referensi yang sudah diketahui konsentrasinya ke dalam larutan sampel. Hal ini untuk mengkonfirmasi identitas salah satu puncak komponen sampel (Harvey, 2000).

2.4.2 Analisis kuantitatif

Analisis kuantitatif dapat dilakukan dengan menggunakan metode *spiking*. Analisis kuantitatif kadar senyawa dalam sampel dapat dihitung menggunakan persamaan dibawah ini (Harris, 1948):

$$(A_{STD} = A_{Total} - A_S) \quad (2.4)$$

$$\frac{C_S}{C_{STD}} = \frac{A_S}{A_{STD}} = \frac{A_S}{(A_{Total} - A_S)} \quad (2.5)$$
$$C_S = C_{STD} \times \frac{A_S}{(A_{Total} - A_S)}$$

Dimana, C_S merupakan konsentrasi sampel, C_{STD} merupakan konsentrasi standar pada saat diinjeksikan, A_S merupakan luas puncak sampel, A_{STD} merupakan luas puncak standar, dan A_{Total} merupakan luas puncak total dari sampel dan standar.