

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. MINYAK NABATI

Minyak nabati termasuk dalam golongan lipid, yaitu senyawa organik yang terdapat dalam alam dan tak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik non polar seperti senyawa hidrokarbon atau dietil eter. Minyak dan lemak hewani maupun nabati memiliki komposisi utama berupa senyawa gliserida dan asam lemak dengan rantai C-nya yang panjang. Asam lemak merupakan asam karboksilat yang diperoleh dari hidrolisis suatu lemak atau minyak dan umumnya mempunyai rantai karbon panjang dan tak bercabang. Gliserida merupakan ester dari gliserol. Gliserida ini terdiri dari monogliserida, digliserida, dan trigliserida tergantung dari jumlah asam lemak yang terikat pada gliserol.

Umumnya minyak nabati mengandung 90–98% trigliserida, yaitu tiga molekul asam lemak yang terikat pada gliserol. Kebanyakan trigliserida minyak dan lemak yang terdapat di alam merupakan trigliserida campuran yang artinya, ketiga bagian asam lemak dari trigliserida itu pada umumnya tidaklah sama. Bila terdapat ikatan tak jenuh, maka asam lemak dengan panjang rantai yang sama akan memiliki titik cair yang lebih kecil. Semakin panjang rantai atom C asam lemak, maka titik cair akan semakin tinggi dan

semakin tinggi pula kestabilan trigliserida dari asam lemak itu terhadap polimerisasi dan oksidasi spontan (7).

Asam lemak yang umum ditemukan dalam minyak nabati adalah asam stearat, palmitat, oleat, linoleat, dan linolenat. Fosfolipida, fosfatida, karoten, tokoferol, dan senyawa belerang juga terkandung dalam minyak nabati walaupun jumlahnya sedikit sekitar 1–5% (7).

Kemurnian minyak dapat dinyatakan dalam bentuk sebagai berikut (8,9):

#### 1. Angka Asam

Angka asam adalah ukuran dari jumlah asam lemak bebas. Perhitungannya dinyatakan sebagai jumlah miligram KOH yang digunakan untuk menetralkan asam lemak bebas yang terdapat dalam 1 gram sampel minyak atau lemak.

#### 2. Angka Penyabunan

Angka penyabunan adalah jumlah miligram KOH yang dibutuhkan untuk menyabunkan 1 gram minyak atau lemak. Tiga mol KOH akan bereaksi dengan 1 mol trigliserida. Angka ini menjelaskan banyaknya asam lemak yang terikat sebagai trigliserida maupun asam lemak bebasnya dalam suatu minyak.

### 3. Angka Iod

Angka iod adalah jumlah gram iod yang dapat diikat oleh 100 gram minyak atau lemak. Ikatan rangkap yang terdapat pada asam lemak yang tidak jenuh akan bereaksi dengan iod. Jadi, angka iod menunjukkan jumlah ikatan rangkap yang ada di dalam minyak.

### 4. Angka Peroksida

Angka peroksida adalah banyaknya miliekivalen oksigen aktif yang terdapat dalam 1000 gram minyak atau lemak. Angka peroksida merupakan informasi yang berguna untuk mengetahui kerusakan yang telah terjadi pada minyak atau lemak akibat reaksi oksidasi. Asam lemak tidak jenuh penyusun suatu trigliserida dapat mengikat oksigen pada ikatan rangkapnya, sehingga membentuk peroksida. Makin besar angka peroksida menunjukkan makin besar pula derajat kerusakan pada minyak atau lemak.

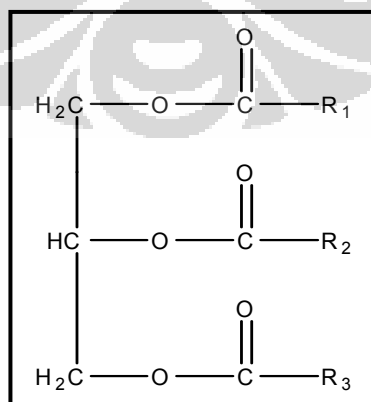
### 5. Densitas (berat jenis)

Berat jenis adalah massa minyak per satuan volume pada suhu tertentu. Metode yang digunakan untuk menentukan berat jenis adalah ASTM D 1298 atau ASTM D 1480. Berat jenis minyak sangat dipengaruhi oleh kejenuhan komponen asam lemaknya, tetapi akan turun nilainya dengan semakin kecilnya berat molekul komponen asam lemaknya.

Tabel 1. Jenis asam lemak yang terkandung dalam minyak nabati (7,10,11)

Jenis Asam Lemak	Nama Sistematis	Struktur	Formula
Asam Laurat	Dodekanoat	12:00	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Asam Miristat	Tetradekanoat	14:0	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Asam Palmitat	Heksadekanoat	16:0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Asam Stearat	Oktadekanoat	18:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
Asam Arakidat	Eikosanoat	20:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
Asam Behenat	Dokosanoat	22:0	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>
Asam Lignoserat	Tetrakosanoat	24:0	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>
Asam Oleat	cis-9-Oktadekenoat	18:1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Asam Linoleat	cis-9,cis-12-Oktadekadienoat	18:2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Asam Linolenat	cis-9,cis-12,cis-15-Oktadekatrienoat	18:3	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Asam Erukat	cis-13-Dokosenoat	22:1	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>

Struktur molekul dari trigliserida dapat dilihat pada gambar 1. Struktur trigliserida dapat memiliki R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> yang sama maupun berbeda-beda. Dapat pula ditemukan dua buah rantai yang sama dan sebuah rantai yang berbeda. Rantai R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> inilah yang digunakan untuk membedakan sifat suatu minyak dengan minyak yang lain.



Gambar 1. Struktur kimia trigliserida (10,11)

## B. MINYAK SAWIT

Minyak sawit diperoleh dari proses pengempaan daging buah kelapa sawit (*Elaeis Guineensis* Jacq) berbentuk kasar berwarna kuning kemerah-merahan sampai warna merah tua. Kelapa sawit merupakan tanaman berkeping satu, termasuk ke dalam famili *Palmae* (12). Nama *Elaeis* berasal dari bahasa Yunani *elaion* yang berarti minyak, sedangkan nama *Guineensis* berasal dari kata *Guinea*, yaitu tempat dimana seorang ahli bernama Jacquin menemukan tanaman kelapa sawit di sana. Minyak hasil pengempaan daging buah kelapa sawit dinamakan *Crude Palm Oil* (CPO) (13).

Berdasarkan titik lelehnya minyak sawit terdiri dari dua fraksi besar, yaitu olein sebagai fraksi yang berwujud cair pada suhu kamar dan stearin sebagai fraksi yang berwujud padat pada suhu kamar (13,14).

Umumnya olein mengandung lebih banyak asam lemak tak jenuh, contohnya asam oleat dan asam linoleat. Sedangkan stearin mengandung lebih banyak asam lemak jenuh, contohnya asam palmitat dan asam stearat (13).

Kandungan minyak sawit antara lain fosfolipida berupa asam-asam lemak terutama asam palmitat (44%), asam oleat (39%), dan asam linoleat (10%); glikolipida; karotenoid ( $\alpha$ - $\beta$  karoten); sterol ( $\beta$ -sitosterol); dan tokoferol ( $\gamma$ -tokotrienol) (13,14). Komponen fosfolipida yang utama adalah lebih banyak terdapat dalam fraksi olein daripada dalam fraksi stearin (13).

Tabel 2. Komposisi asam lemak minyak sawit (CPO), fraksi olein, dan fraksi stearin (13)

Jenis asam lemak	Persen Komposisi		
	CPO	Olein	Stearin
Asam Laurat (C12:0)	0 – 0,4	0,1 – 0,5	0,1 – 0,6
Asam Miristat (C14:0)	0,6 – 1,7	0,9 – 1,4	1,1 – 1,9
Asam Palmitat (C16:0)	41,1– 47,0	7,9 41,7	47,2 – 73,8
Asam Stearat (C18:0)	3,7 – 5,6	4,0 – 4,8	4,4 – 5,6
Asam Oleat (C18:1)	38,2 – 43,6	40,7 – 43,9	15,6 – 37,0
Asam Linoleat (C18:2)	6,6 – 11,9	10,5 – 14,3	3,2 – 9,8
Asam Linolenat (C18:3)	0 – 0,6	0,1– 0,6	0,1 – 0,6
Asam Arakidat (C20:0)	–	0,2 – 0,5	0,1 – 0,6

Ada pemrosesan kelapa sawit di industri sebenarnya dapat dibagi menjadi dua bagian, yaitu pemrosesan untuk mendapatkan minyak yang ada pada sabut kelapa sawit – yang lebih dikenal sebagai minyak sawit (*Palm Oil*) – dan pemrosesan untuk mendapatkan minyak pada inti kelapa sawit, yang lebih dikenal sebagai minyak inti sawit (*Palm Kernel Oil*) (7). Perbedaan keduanya terletak pada komposisi bahan-bahan yang terkandung dalam masing-masing minyak. Minyak sawit banyak mengandung asam palmitat dan asam oleat, sedangkan minyak inti sawit banyak mengandung asam laurat dan asam miristat.

Sifat-sifat minyak sawit, antara lain (13):

1. Dapat melapisi logam dalam keadaan basah atau lembab.
2. Mudah membentuk emulsi dengan air.

3. Asam-asam lemak yang terkandung adalah rantai panjang sehingga tidak mudah menguap.
4. Merupakan sumber energi yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan.

### **C. MINYAK JELANTAH**

Minyak nabati banyak digunakan sebagai bahan untuk makanan dan minyak goreng. Minyak jelantah merupakan minyak nabati yang telah menjadi tidak layak untuk digunakan sebagai bahan makanan karena telah mengalami degradasi kimia dan/atau mengandung akumulasi kontaminan-kontaminan di dalamnya (7).

Minyak jelantah cukup mudah dikenali karena warnanya lebih hitam dibandingkan minyak goreng yang baru dipakai 1–2 kali proses penggorengan (15). Sumber minyak jelantah antara lain dari rumah makan, rumah tangga, pabrik atau perusahaan yang memproduksi bahan makanan dengan proses penggorengan, dan lain-lain.

Minyak jelantah tidak baik digunakan untuk menggoreng bahan makanan karena minyak telah mengalami beberapa kali (3–4 kali) proses penggorengan, dimana ikatan rangkap pada asam lemak tidak jenuh rusak, sehingga yang tersisa hanya asam lemak jenuh (16). Penyakit yang dapat timbul setelah mengkonsumsi makanan yang digoreng menggunakan minyak jelantah antara lain kanker, jantung koroner, stroke, dan hipertensi (17).

Kandungan yang terdapat di dalam minyak jelantah yaitu berupa gugus benzen dimana gugus tersebut dapat memicu terjadinya kanker karena dapat melepaskan senyawa dioksin yang bila masuk ke dalam tubuh menyebabkan sistem reproduksi terganggu dan lama kelamaan akan menyebabkan kanker (17). Namun belum ditemukan mekanisme yang menunjukkan kaitan antara senyawa dioksin dengan penyakit kanker (18).

Senyawa lain yang mungkin terdapat dalam minyak jelantah dan memiliki dampak buruk bagi kesehatan adalah dimer dan trimer triasilgliserol dan polimer lainnya dan *sterol oxide* yang merupakan hasil oksidasi kolesterol. *Sterol oxide* diasosiasikan sebagai penyebab penyumbatan pembuluh darah jantung (arterosklerosis). Minyak jelantah juga berbahaya bagi kesehatan karena mengandung senyawa-senyawa yang bersifat karsinogenik (7).

#### **D. SENYAWA-SENYAWA METIL ESTER DAN METODE ANALISISNYA**

Metil ester merupakan ester asam lemak yang dibuat melalui proses esterifikasi dari asam lemak dengan metanol. Berdasarkan tabel 2 kemungkinan senyawa-senyawa metil ester yang terdapat dalam minyak sawit antara lain metil palmitat, metil oleat, metil linoleat, metil stearat, metil miristat, metil linoleat, metil laurat, dan metil arakidat. Persentase kandungan metil ester dalam minyak kelapa sawit adalah metil palmitat (45%), metil oleat (40%), metil linoleat (10%), metil stearat (4%), dan metil miristat (1%) (19).



Metode analisis metil ester ada tiga macam, yaitu metode kromatografi gas, metode kromatografi cair kinerja tinggi, dan kromatografi lapis tipis. Berikut ini rincian metode analisis senyawa-senyawa metil ester.

### 1. Metode Kromatografi Gas (KG)

- a) Kromatografi gas Shimadzu model GC14BSPL yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, menggunakan kolom kapiler dengan panjang 30 m dan diameter dalam 0,25 mm yang disalut polietilen glikol (PEG). Suhu yang digunakan 350°C. Gas pembawa yang digunakan adalah helium. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan metil ester adalah heptan. Perbandingan mol antara metanol dengan minyak nabati yang digunakan adalah 42:1 (5).
- b) Kromatografi gas Hewlett Packard Plus seri 6890 yang dilengkapi dengan *mass selective detector*, menggunakan kolom Ultra 2 (PMS 5%) dengan panjang 17 m dan diameter dalam 0,2 mm yang disalut DEGS. Suhu awal kolom, akhir kolom, injektor, dan detektor yang digunakan adalah 70°C, 310°C, 250°C, dan 250°C secara berturut-turut. Gas pembawa yang digunakan adalah helium. Volume yang disuntikkan adalah 1 µL (8).
- c) Kromatografi gas Nucon 5765 yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, menggunakan kolom kapiler dengan panjang 30 m dan diameter dalam 0,25 mm yang disalut dietilen glikol suksinat (DEGS). Suhu kolom, injektor, dan detektor yang digunakan adalah 180°C,

240°C, dan 240°C secara berturut-turut. Gas pembawa yang digunakan adalah nitrogen. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan metil ester adalah heksan. Perbandingan mol antara metanol dengan minyak nabati yang digunakan adalah 6:1. Suhu saat reaksi transesterifikasi adalah 60°C. Katalis yang digunakan adalah natrium hidroksida 2% (20).

- d) Kromatografi gas Hewlett Packard Plus seri 6890 yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, menggunakan kolom kapiler polietilen glikol aktif dengan panjang 30 m dan diameter dalam 0,25 mm. Suhu awal kolom adalah 80°C dipertahankan selama 5 menit kemudian diatur dengan pemrograman suhu dengan kenaikan suhu 10°C/menit sampai mencapai suhu 310°C dan dipertahankan selama 1 menit. Gas pembawa yang digunakan adalah helium dengan kecepatan alir gas pembawa 0,7 mL/menit. Volume yang disuntikkan adalah 1 µL. Katalis yang digunakan adalah asam sulfat 1% dan natrium hidroksida 1,4% (21).

## **2. Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

- a) Kromatografi cair kinerja tinggi Shimadzu LC-10AT dengan *refractive index detector* Shimadzu RID-10A, menggunakan kolom STR okta desil silan (ODS)-II dengan panjang 25 cm dan diameter dalam 4,6 mm. Suhu detektor yang digunakan adalah 40°C. Suhu kolom yang digunakan adalah 350°C. Fase gerak yang digunakan adalah metanol

dengan laju alir 1,0 mL/menit. Volume yang disuntikkan adalah 20  $\mu$ L (22).

- b) Kromatografi cair kinerja tinggi Perkin Elmer seri 200 dengan *refractive index detector*, menggunakan kolom A Spheri-5 C-18 dengan panjang 22 cm dan diameter 4,6 mm. Suhu kolom yang digunakan adalah 40°C. Fase gerak yang digunakan adalah metanol dengan laju alir 1,0 mL/menit. Volume yang disuntikkan adalah 20  $\mu$ L (23).
- c) Kromatografi cair kinerja tinggi Shimadzu LC-10AT dengan detektor ultraviolet (UV) pada panjang gelombang 220 nm, menggunakan kolom Capcell Pack C-18 dengan panjang 25 cm dan diameter 4,6 mm. Suhu kolom yang digunakan adalah 30°C. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril–asam fosfat 0,1% = 4:1 dengan laju alir 0,7 mL/menit. Volume yang disuntikkan adalah 20  $\mu$ L (21).

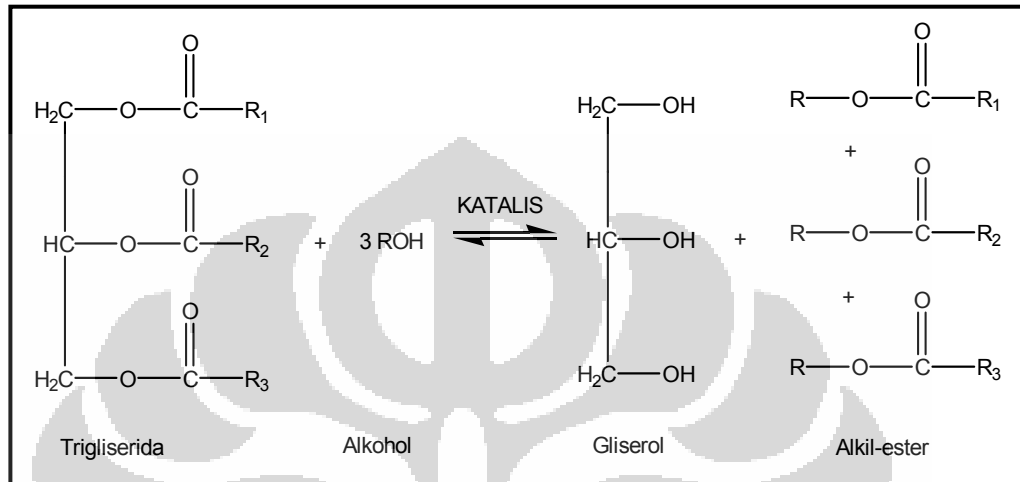
### **3. Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Eluen yang digunakan adalah Heksan–Etil asetat–Asam asetat (90:10:1 %v/v). Bercak diidentifikasi dengan uap iodium. Nilai Rf sampel dibandingkan dengan Rf standar (20).

## **E. REAKSI TRANSESTERIFIKASI**

Reaksi transesterifikasi minyak nabati pertama kali dilakukan oleh E. Duffy dan J. Patrick pada tahun 1853 (4). Proses transesterifikasi minyak

nabati merupakan reaksi antara trigliserida (lemak atau minyak) dengan alkohol untuk menghasilkan alkil-ester dan gliserol (7).



Gambar 2. Reaksi transesterifikasi minyak nabati (4)

Sebuah molekul trigliserida memiliki sebuah molekul gliserol sebagai dasarnya dengan tiga buah asam lemak rantai panjang yang menempel padanya. Dalam proses transesterifikasi minyak nabati ini, molekul trigliserida akan bereaksi dengan alkohol dengan bantuan katalis asam atau basa kuat dan menghasilkan alkil-ester dari asam lemak rantai panjang dan gliserol. Senyawa gliserol yang dihasilkan bukanlah gliserol murni, melainkan gliserol mentah (*crude glycerol*), biasanya memiliki kemurnian kira-kira 95% (7). Senyawa gliserol dapat dimanfaatkan dan memberikan keuntungan karena gliserol dapat digunakan sebagai humektan, pelarut, perawatan kulit, penambah viskositas, plasticizer, emolien, pemanis; untuk industri dinamit (nitrogliserol), kosmetik, sabun cair, lem elastis (14).

Secara stoikiometri, sebenarnya setiap mol trigliserida akan bereaksi dengan 3 mol alkohol untuk membentuk alkil-ester dan gliserol, akan tetapi karena reaksi ini merupakan reaksi yang reversibel, maka biasanya digunakan alkohol dalam jumlah berlebih agar reaksi terdorong ke arah kanan sehingga terjadi konversi yang sempurna dari minyak nabati dan meningkatkan jumlah dari alkil-ester yang terbentuk (7).

Proses transesterifikasi minyak nabati dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain perbandingan mol antara alkohol dengan minyak nabati, suhu reaksi transesterifikasi, lamanya reaksi transesterifikasi, jenis katalis yang digunakan, kemurnian reaktan (terutama kandungan air dalam reaktan), serta kandungan asam lemak bebas dari minyak nabati yang digunakan (1,7).

Jenis katalis yang dapat digunakan dalam reaksi transesterifikasi antara lain katalis basa, seperti kalium hidroksida (KOH) dan natrium hidroksida (NaOH); katalis asam, seperti asam sulfat ( $H_2SO_4$ ), asam fosfat ( $H_3PO_4$ ), dan asam klorida (HCl); biokatalis, seperti enzim lipase (4). Namun, proses transesterifikasi minyak nabati dengan menggunakan katalis basa lebih banyak digunakan. Hal ini disebabkan karena proses transesterifikasi dengan katalis basa ini berlangsung lebih cepat daripada dengan katalis-katalis lainnya, sifat katalis basa yang kurang korosif daripada katalis asam, harga katalis ini lebih murah dibandingkan katalis-katalis lainnya (lebih ekonomis), hanya membutuhkan suhu dan tekanan yang rendah tetapi dapat mencapai konversi hingga 98% (5,24).

Alkohol yang dapat digunakan dalam reaksi transesterifikasi antara lain metanol, etanol, propanol, butanol, dan amil alkohol. Metanol dan etanol yang sering digunakan, khususnya metanol karena metanol lebih murah harganya dibandingkan etanol dan sifat fisika kimianya yang polar dan merupakan alkohol dengan rantai terpendek (1). Jika alkohol yang digunakan adalah metanol maka alkil-ester yang dihasilkan disebut metil ester.

Lamanya proses reaksi transesterifikasi dan suhu yang digunakan bervariasi tergantung jenis katalis yang digunakan. Jika dalam reaksi transesterifikasi digunakan KOH sebagai katalis maka dibutuhkan waktu sekitar setengah sampai satu jam pada suhu sekitar 40–60°C hingga terbentuk dua lapisan (7). Lapisan bagian atas yang terbentuk berwarna bening adalah metil ester dan lapisan bagian bawah yang terbentuk berwarna gelap merupakan gliserol.

Pada lapisan metil ester mungkin terkandung sisa gliserol, katalis, metanol yang tidak bereaksi, dan sabun yang terbentuk selama proses pembuatan metil ester. Namun, zat-zat pengotor tersebut dapat dihilangkan dengan mencuci metil ester dengan air panas sebanyak tiga sampai empat kali dan ditambahkan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat untuk menarik air, kemudian dipanaskan yang bertujuan untuk menghilangkan air yang mungkin terkandung di dalamnya (25).

Skema pembuatan metil ester dari minyak sawit jelantah dapat dilihat pada lampiran 9.

## **F. KROMATOGRAFI GAS**

### **1. Teori**

Kromatografi adalah metode pemisahan suatu campuran menjadi komponen-komponennya yang didasarkan pada distribusi komponen-komponen tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Terjadinya pemisahan komponen-komponen dalam sampel disebabkan karena perbedaan afinitasnya terhadap fase diam dan fase gerak yang berada pada sistem kesetimbangan yang dinamis (26).

Kromatografi gas adalah jenis kromatografi yang menggunakan gas sebagai fase gerak dan fase diamnya berupa cairan atau padatan. Dalam kromatografi gas, zat terlarut terpisah sebagai uap. Ada dua jenis kromatografi gas, yaitu (26,27):

#### **1) Kromatografi gas–cair (KGC)**

Pemisahan terjadi karena perbedaan kelarutan (partisi) relatif sampel antara fase gerak dan fase diam yang berupa cairan dengan titik didih tinggi (tidak mudah menguap) yang terikat pada zat padat penunjangnya.

#### **2) Kromatografi gas–padat (KGP)**

Digunakan suatu zat padat penyerap sebagai fase diamnya dan pemisahan campuran menjadi komponen-komponennya terjadi karena perbedaan adsorpsi relatif masing-masing komponen pada fase diam padatan.

Pemakaian zat cair sebagai fase diam ternyata lebih meluas bila dibandingkan dengan zat padat zat padat, sehingga teknik ini kadangkala dikenal sebagai KGC (26).

Kromatografi gas dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan waktu retensi zat yang dianalisis dengan waktu retensi zat standar. Analisis kuantitatif dilakukan dengan membandingkan tinggi dan luas puncak kromatogram dari zat yang dianalisis dengan tinggi atau luas puncak kromatogram pembanding (28). Perhitungan luas puncak pada kromatogram gas dapat dengan menggunting dan menimbang puncak, dengan planimetri atau perhitungan luas segitiga yang hampir mendekati dengan mengalikan tinggi puncak dengan lebar puncak pada setengah tinggi puncak (9).

Kromatografi gas digunakan untuk memisahkan campuran yang komponen-komponennya dapat menguap pada suhu percobaan (sampai 400°C). Teknik ini jauh lebih unggul dibandingkan dengan teknik kromatografi lainnya dalam hal kecepatan, sensitifitas, spesifitas, dan dalam hal tertentu resolusi atau pemisahan yang dihasilkan lebih sempurna, meskipun harga instrumennya relatif lebih mahal (29).

Resolusi atau daya pisah menunjukkan apakah dua komponen dapat terpisah dengan baik. Daya pisah didefinisikan sebagai jarak antara dua puncak dibagi rata-rata lebar dua puncak yang diukur dari alas puncak. Resolusi merupakan ukuran dari efisiensi kolom. Efisiensi kolom menentukan



pelebaran puncak kromatogram (*peak broadening*) dan efisiensi pelarut menentukan posisi puncak kromatogram (*relative retention*) (29).

Efisiensi kolom dapat diukur dari jumlah "*theoretical plate*" atau HETP (*Height Equivalent of Theoretical Plate*) yaitu panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen cuplikan antara fase diam dan fase gerak. Makin banyak plat teoritis, makin baik daya pisah dari suatu kolom (28).

## **2. Instrumentasi**

Instrumentasi untuk kromatografi gas cukup rumit karena sistem harus tertutup, suhu harus konstan atau dapat diatur dengan tepat serta diperlukan perlengkapan pendeteksi dan perekam yang terpadu. Bagian dari kromatografi gas adalah sebagai berikut:

### **a) Silinder dengan Gas Pembawa (28,29)**

Gas yang biasanya digunakan adalah helium, hidrogen, nitrogen, dan argon. Pilihan gas pembawa terutama tergantung pada karakteristik detektor. Persyaratan untuk gas pembawa adalah inert, koefisien difusi sampel pada gas tersebut rendah, murah, murni dan mudah diperoleh, serta cocok untuk detektor yang digunakan (28). Kecepatan linier dari gas pembawa menentukan efisiensi kolom.

## b) Kolom

Aliran gas selanjutnya menemui kolom yang diletakkan dalam oven bersuhu konstan. Kolom memiliki variasi dalam hal ukuran dan bahan isian. Ukuran yang umum adalah sepanjang 6 kaki dan berdiameter dalam  $\frac{1}{4}$  inci, terbuat dari tabung tembaga atau baja tahan karat; untuk menghemat ruang, bisa dibentuk U atau gulungan spiral. Kolom tanpa *support* jika fase diam melapisi dinding dalam dari kolom (*capillary column*) (30).

Kolom pada kromatografi gas dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok utama, yaitu kolom yang terkemas (*packed column*) dan kolom tabung terbuka (*open tubular column*). *Packed column* biasanya mempunyai panjang antara 1-10 meter dengan diameter antara 3-10 mm atau sampai lebih dari 10 cm bagi kolom preparatif. Kolom diisi dengan suatu bahan padat halus (adsorben atau *support*) dengan luas permukaan besar yang relatif inert (29).

Kolom tabung terbuka disebut juga kolom kapiler. *Capillary column* panjangnya dapat mencapai 10–50 meter dengan diameter 0,2–1,2 mm. Berdasarkan fase diam dilekatkan pada kolom ada dua jenis kolom tabung terbuka, yaitu (28,31):

### 1) Kolom WCOT (*Wall Coated Open Tubular*)

Pada kolom tabung terbuka jenis ini, fase diam cair dilapiskan secara langsung pada dinding dalam tabung dan tertahan dalam dinding dalam jumlah sedikit.

## 2) Kolom SCOT (*Support Coated Open Tubular*)

Pada kolom tabung terbuka jenis ini, fase diam cair dilapiskan pada *support*. Jumlah fase diam pada kolom SCOT lebih banyak dibandingkan dengan kolom WCOT.

**Support.** Penggunaan *support* dimaksudkan untuk memperoleh permukaan yang luas dan inert bagi lapisan fase diam. Dalam perdagangan dikenal dengan *Chromosorb*. Ada dua jenis *Chromosorb* yaitu *Chromosorb P* (warna pink, sifat adsorpsi kuat, cocok untuk pemisahan hidrokarbon) dan *Chromosorb W* (warna putih, nonadsorptif, cocok untuk pemisahan senyawa polar) (29).

**Fase diam.** Pemilihan fase diam disesuaikan dengan polaritas sampel. Untuk sampel polar maka digunakan fase diam yang juga polar. Dengan pemilihan fase diam yang tepat maka komponen-komponen dengan titik didih yang sama masih dapat dipisahkan karena adanya perbedaan koefisien partisi (29).

Pemilihan fase diam cair yang sesuai untuk pemisahan tertentu sangat penting. Secara garis besar, fase diam cair dapat dikelompokkan menjadi (28):

### 1) Fase cair paling polar

Contohnya: carbowax, manitol, castorwax.

### 2) Fase cair polar

Contohnya: etofat, XE-60, sianoeilsukrosa.

3) Fase cair kepolaran menengah

Contohnya: OV-17, polivinil eter, dimetilsulfolan.

4) Fase cair kepolaran rendah dan nonpolar

Contohnya: SE-30, skualana, apiezon.

c) Detektor (28,31)

Detektor berfungsi untuk mendeteksi dan mengukur jumlah komponen yang telah terpisah yang terdapat dalam aliran gas pembawa yang meninggalkan kolom. Pemilihan detektor tergantung pada sifat dan konsentrasi komponen-komponen yang telah terpisah. Macam detektor yang dapat digunakan pada kromatografi gas adalah:

1) Detektor konduktivitas panas (*Thermal Conductivity Detector/TCD*)

Prinsip kerjanya adalah suhu filamen meningkat dengan adanya analit pada gas pembawa yang melaluinya. Hal tersebut akan menyebabkan terjadinya kenaikan resistensi.

2) Detektor ionisasi nyala (*Flame Ionization Detector/FID*)

Prinsip kerjanya adalah komponen yang dibakar pada suatu nyala akan menghasilkan ion, ion-ion ini dikumpulkan dan diubah menjadi arus listrik

3) Detektor penangkap elektron (*Electron Capture Detector/ECD*)

Prinsip kerjanya adalah pada waktu spesies-spesies yang bersifat elektronegatif melewati detektor, spesies-spesies tersebut menangkap elektron-elektron termal yang mempunyai energi rendah. Hal tersebut akan menyebabkan penurunan arus sel.

4) Detektor fotometri nyala (*Flame Photometric Detector/FPD*)

Prinsip kerjanya adalah senyawa-senyawa nitrogen dan fosfor yang dibakar dalam suatu nyala akan menghasilkan spesies kemiluminesen yang dapat dimonitor pada panjang gelombang selektif.

5) Detektor nitrogen fosfor (*Nitrogen Phosporous Detector/NPD*)

Prinsip kerjanya adalah senyawa-senyawa nitrogen dan fosfor akan menyebabkan peningkatan arus pada nyala yang diperkaya dengan uap garam logam alkali.

d) Regulator Tekanan dan Regulator Aliran

Pengatur tekanan digunakan untuk mengatur tekanan gas pembawa dan untuk menjaga agar tekanan gas pembawa tersebut konstan, sedangkan pengendali aliran digunakan untuk menjaga agar aliran gas pembawa konstan. Aliran gas yang konstan sangat diperlukan pada KG agar diperoleh hasil analisis yang memuaskan (28).

e) Sistem Injeksi Sampel

Sampel diinjeksikan dengan suatu *microsyringe* melalui suatu septum karet silikon ke dalam kotak logam yang panas. Kotak logam tersebut dipanaskan dengan pemanas listrik. Banyaknya sampel yang diinjeksikan adalah sekitar 0,5-10  $\mu\text{L}$  (32).

f) Perekam

Perekam yang dihubungkan dengan bagian luar detektor berfungsi untuk menghasilkan gambaran yang disebut kromatogram. Kromatogram yang dihasilkan dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif (28).

Akurasi suatu kromatogram pada suatu daerah pembacaan ditentukan oleh pemilihan pencatat sinyal atau perekamnya. Kadangkala sinyal perlu diperkuat. Respon melewati skala penuh haruslah 1 detik. Kepekaan perekam adalah 10mV dengan rentang antara 1-10 mV (31).

g) Oven dengan Termostat untuk b, c, dan e

h) Sistem Pengolahan Data

Peran pengolahan data dilakukan oleh komputer. Informasi yang diperoleh dapat dimanfaatkan dalam analisis kualitatif dan kuantitatif (29).

### 3. Analisis Kuantitatif (27,29,33)

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu:

#### a) Metode Baku Luar (29)

Dibuat kurva kalibrasi zat baku atau standar, dengan cara membuat larutan baku dengan berbagai macam konsentrasi larutan sampel yang akan dianalisis, disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi atau perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan (29).

$$C_s = \frac{A_s}{A_{st}} \times A_{st}$$

Dimana:

$C_s$  = konsentrasi sampel

$C_{st}$  = konsentrasi standar

$A_s$  = luas puncak sampel

$A_{st}$  = luas puncak standar

b) Metode Baku Dalam (27,33)

Baku dalam merupakan senyawa yang berbeda dengan analit, tetapi senyawa ini harus terpisah dengan baik selama proses pemisahan. Baku dalam dapat menghilangkan pengaruh karena adanya perubahan-perubahan pada ukuran sampel atau konsentrasi karena variasi instrumen. Jika suatu sampel memerlukan perlakuan sampel yang sangat signifikan (memerlukan tahapan seperti derivatisasi, ekstraksi, dan filtrasi yang menyebabkan berkurangnya sampel), maka sangat dibutuhkan penggunaan baku dalam untuk mengoreksi hilangnya sampel (27).

Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan dihitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Dibuat kurva antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan metode ini adalah kesalahan pada volume injeksi dapat dieliminir. Kesulitan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat (33).

Syarat baku dalam yang ideal, antara lain (33):

- 1) Murni dan mudah diperoleh.
- 2) Tidak terdapat dalam sampel atau cuplikan.
- 3) Mempunyai puncak yang terpisah baik dari cuplikan.
- 4) Mempunyai sifat fisikokimia yang mirip dengan cuplikan.



- 5) Tidak bereaksi dengan cuplikan dan fase gerak.
- 6) Bukan merupakan metabolit dari cuplikan.
- 7) Mempunyai respon detektor yang hampir sama dengan cuplikan pada konsentrasi yang digunakan.
- 8) Harus terelusi dekat dengan puncak yang diukur.

c) Metode Normalisasi atau Penormalan Luas (27,33)

Penormalan luas adalah menghitung susunan dalam % dengan mengukur luas setiap puncak dan membagi masing-masing luas puncak dengan luas keseluruhan.

Cara ini mengasumsikan semua komponen analit terelusi dari kolom telah terdeteksi. Cara ini sering dipakai pada kromatografi gas karena diasumsikan bahwa setiap komponen analit memperoleh respon detektor ionisasi nyala (FID) yang sama (33). Untuk analisis kuantitatif diasumsikan bahwa luas puncak sebanding dengan konsentrasi zat. Setiap luas puncak yang terdeteksi kemudian diekspresikan sebagai suatu persentase dari total luas puncak yang terdeteksi (27). Komposisi relatif masing-masing komponen dalam suatu campuran dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% x_1 = \frac{A_x}{\sum_{i=1}^n A_i} \cdot 100\%$$

Dimana:

$x_1$  = salah satu komponen dari sebanyak n komponen

A = luas puncak yang terdeteksi

#### 4. Perhitungan dalam Kromatografi Gas (26)

##### a) Retensi relatif ( $\alpha$ )

$$\alpha = \frac{t_2 - t_a}{t_1 - t_a}$$

Dimana:

$t_1$  = waktu retensi baku pembanding

$t_2$  = waktu retensi zat uji

$t_a$  = waktu retensi komponen inert (fase gerak)

##### b) Resolusi (R)

$$R = 2 \frac{t_2 - t_1}{W_2 + W_1}$$

Dimana:

$t_1$  dan  $t_2$  = waktu retensi kedua komponen

$W_1$  dan  $W_2$  = lebar alas puncak kedua komponen

##### c) Jumlah lempeng teoritis (N)

$$N = 16 \frac{t^2}{W^2}$$

Dimana:

t = waktu retensi zat

W = lebar alas puncak

**d) HETP**

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

Dimana:

L = panjang kolom

N = jumlah lempeng teoritis

**e) Faktor kapasitas (k')**

$$k' = \frac{t}{t_a} - 1$$

Dimana:

t = waktu retensi zat

t<sub>a</sub> = waktu retensi fase gerak

**f) Faktor ikutan (t<sub>f</sub>)**

$$t_f = \frac{W_{0,05}}{f}$$

Dimana:

W<sub>0,05</sub> = lebar alas puncak pada 5% tinggi

f = jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak dihitung dengan ketinggian 5% dari garis dasar

