



PENYUSUN

Mursalim, S.Pd.,M.Kes
Zulfikar Ali Hasan, S.ST.,M.Kes
Ridho Pratama, S.Si.,M.Si

KEMENTERIAN KESEHATAN RI
POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES MAKASSAR
JURUSAN ANALIS KESEHATAN
2019

BUKU AJAR

INSTRUMENTASI

PENULIS

MURSALIM

Unit Penelitian Politeknik Kesehatan Makassar

2019

BUKU AJAR

INSTRUMENTASI

ISBN 978-623-7684-20-6



Penulis : 1. Mursalim, S.Pd.,M.Kes
2. Zulfikar Ali Hasan, S.ST.,M.Kes
3. Ridho Pratama, S.Si.,M.Si

ISBN : 978-623-7684-20-6
Editor : Mursalim S.Pd.,M.Kes
Penyunting : Ridho Pratama S.Si.,M.Si
Desain Sampul dan Tata Letak : Mursalim

Penerbit :

Unit Penelitian Poltekkes Makassar
Jl. Bendungan Bili-Bili No. 1
Makassar 90222
Telp (0411) 869826
Fax (0411) 841862
Email :info@poltekkes-mks.ac.id

Redaksi :

Jl. Bendungan Bili-bili No.1
Makassar 90222
Telp +62811441596

Distributor Tunggal :

Unit Penelitian Poltekkes Makassar
Cetakan Pertama, November 2019

Hak Cipta dilindungi undang-undang
Dilarang memperbanyak karya tulisan dalam bentuk dan dengan cara
apapun tanpa ijin tertulis
dari penerbit

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas terbitnya “BUKU AJAR INSTRUMENTASI” Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Makassar sebagai pedoman dalam kegiatan Proses belajar mengajar teori dan praktikum Instrumentasi di Laboratorium.

Buku ini disusun dengan tujuan menyediakan bahan ajar mata kuliah Instrumentasi pada Teknologi Laboratorium Medis dengan acuan standar kompetensi. Buku ini dirancang untuk digunakan secara nasional.

Terima kasih kepada Bapak Dr Ir. H Agustian Ipa, M.Kes selaku Direktur Poltekkes Kemenkes Makassar, Bapak H.Kalma S.Pd.,M.Kes selaku Ketua Jurusan Teknologi Laboratorium Medis serta Hj Nurlia Naim S.Si.,M.Kes selaku Ketua Prodi D4 Analis Kesehatan dan Bapak Nuradi S.Si.,M.Kes selaku Ketua Prodi D3. Terima Kasih juga di sampaikan kepada Tim Pengajar Instrumentasi pada Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Program Studi D3 dan D4 atas kontribusinya dalam penyusunan buku ini.

Kami .menyadari masih terdapat kekurangan dalam buku ini untuk itu kritik dan saran terhadap penyempurnaan buku ini sangat diharapkan, sehingga buku ajar ini dapat memberi mamfaat bagi Mahasiswa Teknologi Laboratorium Medis khususnya dan mahasiswa kesehatan lainnya.

Dan akhirnya kami mengucapkan Jazakumullahu khairan

Wassalamu alaikum Warahkmatullahi Wabarakatuh

Makassar, Desember 2019

Penyusun,

DAFTAR ISI

SAMPULLUAR.....	i
ISBN BUKU AJAR.....	ii
SAMPULDALAM.....	iii
KATA PENGANTAR.....	lv
DAFTAR ISI	v
PENDAHULUAN.....	1
Bab 1 TIMBANGAN DAN NERACA Neraca.....	5
Bab 2 ALAT ALAT GELAS.....	9
BAB 3 ALAT STERILISASI.....	16
BAB 4 CENTRIFUGE.....	28
BAB 5 FOTOMETER.....	35
BAB 6 KROMATOGRAFI.....	52
BAB 7 POTENSIOMETER.....	67
BAB 8 TURBIDIMETER.....	71
BAB 9 POLARIMETER.....	74
BAB 10 REFRAKTOMETER.....	77
BAB 11 MIKROSKOP	80
BAB 12 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).....	86
DAFTAR PUSTAKA.....	92

PENDAHULUAN

INSTRUMENTASI LABORATORIUM

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui penggunaan dan pemeliharaan alat-alat gelas yang digunakan di laboratorium
2. Mengetahui penggunaan dan pemeliharaan alat-alat yang digunakan dalam bidang Hematologi
3. Mengetahui penggunaan dan pemeliharaan alat-alat yang digunakan dalam bidang Kimia Klinik
4. Mengetahui penggunaan dan pemeliharaan alat-alat yang digunakan dalam bidang Mikrobiologi
5. Mengetahui penggunaan dan pemeliharaan alat-alat yang digunakan dalam bidang Parasitologi
6. Mengetahui penggunaan dan pemeliharaan alat-alat yang digunakan dalam bidang Kimia Air Makanan dan Minuman
7. Mengetahui penggunaan dan pemeliharaan alat-alat yang digunakan dalam bidang Transfusi darah
8. Mengetahui penggunaan dan perawatan alat kromatografi
9. Mengetahui penggunaan dan perawatan oven, autoklaf, waterbath, inkubator, hotplate
10. Mengetahui penggunaan dan perawatan mikroskop
11. Mengetahui penggunaan dan perawatan microtome
12. Mengetahui penggunaan dan Perawatan Spektrofotometer
13. Mengetahui penggunaan dan perawatan elektrolit analyzer
14. Mengetahui penggunaan dan perawatan blood gas analyzer
15. Mengetahui penggunaan dan perawatan alat GC MS
16. Mengetahui penggunaan dan perawatan alat elektroforesis dan densitometer

B. Pendahuluan

1. Pengertian dan Acuan Tentang Praktikum di Laboratorium

Laboratorium adalah tempat dilakukannya percobaan atau penelitian (Anonim,1994). Tempat ini merupakan tempat tertutup, kamar atau ruangan yang terbuka (lapangan). Setiap sekolah yang mempunyai laboratorium sudah tentu harus mendapatkan perhatian dan pengelolaan sebagaimana mestinya.sebab jika penggunaan laboratorium tidak dioptimalkan maka kesempatan bagi siswa untuk mengetahui hubungan antara teori dan praktek akan berkurang.

Praktikum dalam pendidikan dapat diartikan sebagai suatu metode pendidikan untuk belajar dan mempraktekkan segala aktivitas dalam proses belajar mengajar untuk menguasai suatu materi pelajaran. Pentingnya praktikum dikemukakan oleh (Amstrong Iyon Kertawijaya, 1993), manfaat dari praktikum adalah sebagai berikut :

1. Pengetahuan dipelajari melalui kontak secara langsung dengan alat-alat dan bahan yang akan digunakan.
2. Kebebasan individu dilaksanakan sebagai dasar dalam belajar.
3. Merujuk minat dan mengantisipasi fenomena alam
4. Melatih dan mempertimbangkan dan menggunakan kata-kata dan ungkapannya sebagaimana obyeknya.
5. Mengembangkan karakter intelektual dan moral siswa.
6. Memupuk sikap untuk melakukan dalam memecahkan masalah.

Lebih lanjut dalam Settu (1987) menjelaskan beberapa pengertian laboratorium, sebagai berikut :

- a. Laboratorium merupakan wadah yaitu tempat, gedung, ruangan, dengan segala macam peralatan yang diperlukan untuk kegiatan ilmiah.
- b. Laboratorium dapat merupakan sarana, media dimana dilakukan kegiatan belajar mengajar. Dalam hal ini laboratorium dilihat sebagai perangkat lunak (soft ware).
- c. Laboratorium dapat diartikan sebagai pusat kegiatan ilmiah yang menentukan kebenaran ilmiah dan penerapannya.

- d. Dilihat dari segi fungsinya, maka laboratorium merupakan tempat dimana guru, siswa dan orang lain yang melakukan kegiatan kerja ilmiah dalam rangka kegiatan belajar yang menghasilkan sesuatu.
- e. Dilihat dari segi kerjanya, laboratorium merupakan tempat dimana dilakukan kerja yang menghasilkan sesuatu.
- f. Laboratorium dapat diartikan sebagai pusat inovasi.

Menurut Soejoto (1994) dalam upaya peningkatan kualitas laboratorium perlu kiranya dilaksanakan program-program sebagai berikut:

- a. Melaksanakan kalibrasi terhadap semua peralatan laboratorium.
- b. Melaksanakan standarisasi terhadap semua reagensia yang dipakai.
- c. Menyelenggarakan kontrol kualitas laboratorium baik secara internal maupun eksternal.
- d. Meningkatkan pengetahuan dan keterampilan para tehnisi laboratorium.
- e. Mengadakan konsultasi/ alih informasi antar laboratorium.

Situasi dalam industri kimia saat ini memerlukan kontrol analisis yang cepat sekaligus terpercaya dari keseluruhan jalannya proses produksi dari bahan mentah melalui produk antara sampai produk akhir. Besarnya makna praktis kontrol semacam ini ditunjukkan oleh evolusi kimia analisis sendiri yang kita saksikan saat ini. Metode dan proses baru yang disempurnakan terus dikerjakan, pereaksi dan instrumen modern terus diterapkan, alat alat yang semakin sempurna dan pereaksi dengan kemurnian tinggi terus dikembangkan untuk laboratorium analisis, metode-metode yang telah mantap terus dibakukan, sehingga pada saat ini kontrol analisis terutama dalam beberapa bidang telah mencapai derajat kesempurnaan dan ketelitian yang tinggi.

2. *Kesalahan-kesalahan bekerja di laboratorium*

Kenyataan adanya kesalahan yang selalu menyertai hasil analisis dapat didemonstrasikan secara nyata dengan melakukan sejumlah penetapan paralel sampel yang homogen sempurna dimana akan diperoleh hasil dengan beberapa perkecualian, saling agak berbeda. Kesalahan random yang menyertai setiap penetapan, sangat tidak teratur dan biasanya kecil, sehingga

hasil nilai rata-ratanya tidak menyimpang dengan nilai sebenarnya, dan kesalahan itu hanya menyebabkan hasil penetapan paralel sedikit saling berbeda satu dari yang lain dan dari hasil rata-rata.

Pengetahuan *instrumentasi* adalah salah satu bagian dari cara berlaboratorium yang baik (Good Laboratory Practices), yang mutlak harus diketahui dan dilakukan dengan baik dan benar agar instrumentasi yang tersedia dapat digunakan untuk analisa secara teliti, peka dan tahan lama. Pengetahuan dapat diperoleh dengan cara mempelajari secara teoritik, pengenalan dan peragaan alat atau praktek menggunakan alat yang bersangkutan. (Pusdiknakes : 1995).

Kesalahan bekerja dilaboratorium umumnya disebabkan oleh :

- a. Kesalahan tenaga laboratorium sendiri.
- b. Kesalahan alat (Instrumental errors).
- c. Kesalahan tambahan.
- d. Kesalahan metode (errors method).

Kesalahan-kesalahan tersebut dapat dikenal atau diketahui apabila dimiliki suatu pengetahuan tentang bekerja di laboratorium yang baik serta memiliki pengetahuan tentang bekerja di laboratorium yang baik serta memiliki pengetahuan yang baik.

Ada beberapa faktor yang dapat mengakibatkan accuracy dan presisi yang belum tidak tepat dalam menggunakan alat laboratarium yaitu :

1. Ketepatan dalam menimbang
2. Ketepatan dalam melarutkan di labu ukur
3. Ketepatan dalam memipet
4. Ketepatan dalam membaca buret
5. Ketepatan dalam membaca spektrofotometer
6. Faktor faktor lain misalnya alat, listrik dan sebagainya.

Pelaksanaan praktikum di Akademi Analis Kesehatan ditujukan untuk pelayanan laboratorium di bidang Kesehatan dan Industri. Dalam melakukan pemeriksaan laboratorium dibidang Kesehatan maka akan mendapatkan suatu hasil pemeriksaan.

BAB 1 . TIMBANGAN/ NERACA

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui jenis jenis timbangan di Laboratorium
2. Mengetahui cara perawatan timbangan/neraca
3. Membedakan antara neraca rem dan neraca goyangan
4. Mengoperasikan timbangan/ neraca dengan baik dan benar

B. Pendahuluan

Penimbangan adalah pekerjaan yang paling penting dalam analisis kimia. Penimbangan atau penggunaan neraca di laboratorium adalah untuk mengetahui jumlah beban/zat dalam analisa. Massa dari suatu bahan yang direaksikan atau hasil analisis yang perlu diukur dan diketahui. Pengukuran massa secara langsung adalah tidak mungkin, maka yang dapat diamati adalah berat yaitu hasil kali massa dengan gravitasi.

Jenis neraca yang umum digunakan di laboratorium:

a. Berdasarkan sistem penimbangan

❖ *Neraca analitik mekanik*

Neraca analitik mempunyai ketelitian baca (readability) minimum 0,1 mg dan daya muat (capacity) maksimum 200 gram.

❖ *Neraca analitik elektrik*

Neraca yang mempunyai ketelitian yang tinggi

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam menggunakan neraca analitik mekanik yaitu :

1. Kedudukan neraca harus mendatar untuk ini dapat dilihat pada “water pass” (bandul logam runcing gelas berisi air dan gelembung udara) sudah menunjukkan pada posisi yang benar.
2. Goyangan jarum neraca harus lancar dan teratur (mekanik) atau getaran jarum merupakan getaran terendam.
3. Anak timbangan serta kelengkapan yang ada didalam kotak anak timbangan isinya lengkap satu set.

4. Sikap duduk pada waktu menimbang harus tegak lurus terhadap meja neraca untuk menghindari kesalahan pembacaan titik balik.
5. Pada saat menimbang almari neraca harus selalu dalam keadaan tertutup rapat.
6. Pada saat menimbang harus menggunakan botol timbang, kaca arloji atau kertas timbang sebagai wadah.
7. Pemberian beban neraca tidak boleh melebihi muatan maksimum yang diperbolehkan.

Kesalahan pada waktu menimbang dengan menggunakan neraca analitik mekanik:

1. Perubahan sifat benda setimbang
2. Lengan neraca yang tidak sama panjang
3. Pengaruh tekanan ke atas terhadap anak timbangan oleh udara

Beberapa hal yang perlu diperhatikan pada penggunaan *neraca elektrik*

1. Sebelum dihubungkan dengan aliran listrik harus diperhatikan tegangan yang diperlukan.
2. Yakinkan bahwa neraca serta didalam almari neraca telah bersih dan posisi neraca telah dalam keadaan mendatar dan seluruh tombol pengatur dalam posisi nol dan almari kaca dalam keadaan tertutup.



3. Hidupkan neraca dan tunggu sampai angka menunjukkan 0.0000g.
4. Penimbangan dapat dilakukan setelah dalam keadaan kosong posisi menunjukkan nol.
5. Berat yang ditunjukkan langsung dicatat.
6. Jika penimbangan telah selesai seluruh tombol pengatur beban dikembalikan pada posisi nol.

b. Berdasarkan kapasitas muatan

- 1). Timbangan gram (gram balance)
- 2). Timbangan miligram (miligram balance)
- 3). Timbangan analitik (analitical balance maksimum 160 – 200 g)

- 4). Timbangan semimikro (semi mikrobalance maksimum 30-60 g)
- 5). Neraca mikro (micro balance maksimum 150 mg)
- 6). Neraca Ultramikro (ultra mikrobalance maksimum 15 mg)

c. Berdasarkan jumlah daun neraca

- 1) Neraca dengan daun neraca tunggal (single pan balance)
- 2) Neraca dengan daun neraca ganda (Double pan balance)

Prosedur Kerja

Cara Penimbangan Menggunakan Neraca Teknis

1. Periksa terlebih dahulu keadaan neraca, kedudukan neraca dan perlengkapannya.
2. letakkan tempat menimbang (botol timbang, kertas timbang atau arloji) pada piring neraca sebelah kiri, letakkan anak timbangan pada piring neraca sebelah kanan, kemudian atur sampai seimbang.
3. Tambahkan anak timbangan pada piring neraca sebelah kiri sebarat zat yang akan ditimbang.
4. Dengan menggunakan spatel tambahkan zat yang akan ditimbang ke dalam tempat menimbang pada piring neraca sebelah kiri dan sebelah kanan seimbang.
5. Pindahkan zat yang ditimbang ketempat yang akan dipergunakan untuk melarutkan zat tersebut.

Ada banyak sumber kesalahan dalam menimbang suatu benda di atas



suatu neraca, yaitu antara lain :

1. Kesalahan yang diakibatkan oleh lengan neraca yang tidak sama pada neraca analitik (Ayun).
2. Kesalahan pada anak timbangan analitik

Kesalahan ini meliputi : mengambil anak timbangan tidak dengan menggunakan pinset, juga anak timbangan sebagai penyeimbang dalam penimbangan tidak ditambah sesuai

dengan urutan ukurannya, hal ini berpengaruh terhadap berat benda yang ditimbang.

3. Perubahan derajat kelembaban atau kadar Karbon Dioksida, misalnya suatu zat yang akan dianalisa biasanya dikeringkan sebelum ditimbang dan dalam proses gravimetric suatu endapan akhir biasanya dipanaskan pada suhu tinggi. Bahan-bahan demikian mungkin dengan mudah ditambah beratnya karena mengambil uap air dan karbon dioksida dari udara sewaktu proses penimbangan, karena itu bejana tertutup atau botol timbang biasanya dipergunakan untuk membuat sample dan endapan yang dibakar biasanya ditimbang dalam cawan yang tertutup.
4. Elektrifikasi
Sebuah bejana gelas tidak boleh dihapus dengan kain kering sebelum ditimbang karena mungkin memperoleh suatu muatan listrik statistik yang mempengaruhi penimbangan. Bejana yang bermuatan tertarik oleh berbagai bagian neraca dan sebuah kesalahan dalam bobot dapat terjadi, akibat ini tidak jelas jika kelembaban tinggi.
5. Suhu
Kesalahan pada penimbangan dapat terjadi apabila suhu benda dan neraca berbeda / tidak sama.
6. Kesalahan yang terjadi juga dapat disebabkan Si penimbang, apakah ia teliti atau tidak, memperhatikan prosedur kerja atau tidak, dan sebagainya.

Latihan

1. Jelaskan hal hal yang perlu diperhatikan dalam meninmbang menggunakan neraca goyangan
2. Tuliskan jenis jenis neraca
3. Apakah perbedaan antara neraca teknis dengan neraca halus

BAB 2

ALAT-ALAT GELAS

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui alat alat gelas yang digunakan di Laboratorium
2. Mengetahui fungsi dari alat alat gelas
3. Mengetahui kegunaan dari alat alat gelas
4. Mengetahui cara perawatan alat alat gelas

B. Pendahuluan

Peralatan Laboratorium pada dasarnya dapat dikelompokkan dalam tahap prainstrumentasi, instrumentasi, dan pasca instrumentasi. Peralatan dasar yang mutlak dan umum digunakan adalah alat gelas. Gelas adalah suatu zat amorf yang diperoleh dari mencampur bahan-bahan anorganik yang setelah dilebur pada suhu tinggi dan didinginkan menjadi benda padat.

Berdasarkan jenis dan bahan komposisi dari bahan anorganik yang menyusunnya ,ada beberapa jenis gelas yaitu gelas biasa, gelas timbal, gelas borosilikat dan gelas leburan silica.

Alat gelas yang digunakan dilaboratorium umumnya merupakan gelas borosilikat. Gelas ini terbuat dari kuarsa/silikat oksida berkualitas tinggi boron oksida, aluminium oksida dan natrium oksida. Gelas jenis ini mencair pada suhu agak tinggi dan mempunyai angka muai yang kecil, oleh karena itu dapat dipanaskan hingga suhu tinggi dan dapat direndam dalam air dingin atau es tanpa terjadi keretakan dan pecah. Selain itu gelas borosilikat juga tidak bereaksi dengan bahan kimia sehingga cocok digunakan sebagai alat gelas Laboratorium.

1. *Pipet*

a. *Pipet Volumetrik*

Pipet Volumetrik adalah contoh pipet transfer jenis to deliver (TD) dirancang untuk memindahkan cairan atau memipet sejumlah volume cairan dengan teliti atau seksama. Pipet ini terbuat dari gelas jenis soda jernih (kaca kelas A) yaitu yang memenuhi standar *National Bureau of*

Standards Amerika, semacam badan Standar Nasional Indonesia (NSI). Bagian tengah dari pipet menggelembung silindris dan besar volume tertera dibagian atas pipet, pipet bagian bawah dibuat beransur mengecil sedemikian rupa agar cairan yang tersisa diujung pipet tidak akan menyebabkan kesalahan pengukuran. Kapasitas pipet ini 0,5 -100 ml, yang ketepatan volumenya berkurang seiring dengan makin kecilnya ukuran pipet (*Astrawinata.DAW,2004*).

Pipet terbuat dari gelas jenis soda jernih, mempunyai kapasitas 0,5 hingga 100 ml. Pipet volume digunakan untuk mengambil cairan, memipet sejumlah volume cairan dengan teliti atau seksama. Pipet volume ada yang dilengkapi pengaman. Penghisap larutan menggunakan pipet melalui mulut harus dilakukan secara hati-hati, agar tidak tertelan/ terhisap hingga mulut. Penghisapan cairan dilakukan sampai 1-2 cm diatas garis tanda, kemudian diangkat dan dibersihkan/dikeringkan bagian ujung luar dari pipet dengan menggunakan kertas penghisap dan dikeluarkan secara hati-hati hingga tanda, kemudian alirkan isi dengan posisi pipet tegak lurus terhadap wadah yang akan digunakan dengan ujung pipet menempel pada dinding bagian dalam dari wadah. Jangan menghisap bahan beracun atau zat yang bersifat keras (asam, basa kuat) melalui mulut akan tetapi gunakan penghisap karet atau digunakan aspirator. Untuk mengeluarkan isi pipet jangan ditiup dengan mulut, tetapi cukup cukup dengan teknik menggoreskan ujung pipet pada dinding dalam dari wadah sebanyak 3 kali.

Pipet volume ada yang dilengkapi pengaman, mengisap larutan menggunakan pipet melalui mulut harus dilakukan secara hati-hati agar tidak terhisap hingga mulut.

b. Pipet Ukur

Pipet ukur terbuat dari gelas soda jernih mempunyai kapasitas 0,01-50 ml. Pipet ukur digunakan untuk mengambil, memindahkan sejumlah volume cairan dan tidak dianjurkan untuk mengukur standar atau sample karena dianggap tidak setepat pipet volumetric atau kurang teliti. Pipet jenis ini yang umum digunakan adalah pipet serologic dan pipet Mohr, dimana pipet serologic ukurannya tertera sampai bagian ujung pipet (*Graduated*). Pipet Mohr skala ukurannya berakhir sebelum ujung pipet

(Measuring). Pada pipet serologic cairan sisa perlu ditiup setelah aliran berhenti. Untuk pipet Mohr aliran justru harus dikontrol agar jangan sampai terlanjur mengalir keluar melebihi volume yang diinginkan karena skala berhenti sebelum ujung pipet berakhir.

Perawatan Pipet

Perawatan pipet harus diperhatikan dengan baik terutama larutan yang bersifat kental seperti serum, plasma atau darah dan reagensia harus dibersihkan dengan menggunakan detergen dan secara berkala direndam dalam cairan pelarut protein seperti extran. Apabila tidak tersedia larutan komersial dapat dilakukan dengan merendam semalam dalam larutan dikromat. Sebanyak 100 gr kalium dikromat dilarutkan dengan 250 ml asam sulfat pekat dalam aquades sampai 1 liter. Apabila pipet tersumbat bekuan darah direndam dalam larutan KOH 10% semalam (*Astrawinata.DAW,2004*). Untuk pipet yang belum digunakan atau masih baru direndam dalam larutan HCl 2% selama 24 jam selanjutnya dicuci 2 kali dengan air kran dan bilas dengan aquades dan keringkan pada suhu kamar.

Kalibrasi Pipet

Sebelum menggunakan pipet sebaiknya dilakukan kalibrasi untuk mengetahui besarnya penyimpangan yang mungkin terjadi. Caranya adalah dengan mengukur air pada suhu kamar. Untuk ini diperlukan alat timbang halus dan wadah penampung air yang bersih, kering dan bertutup. Pertama-tama ukur suhu air yang akan ditimbang sampai 1 angka dibelakang koma. Kemudian timbang berat wadah penampung sampai 1 angka dibelakang koma dalam satuan mg (B_1). Wadah tidak boleh dipegang langsung dengan jari tetapi harus menggunakan tissue, sarung tangan atau penjepit agar lemak atau protein pada kulit petugas tidak menambah berat wadah. Isi wadah dengan volume air yang diukur menggunakan pipet yang akan dikalibrasi dan tutup kembali. Timbang wadah yang berisi air tersebut (B_2). Lihat berat jenis air pada suhu kamar setempat pada table konversi berat jenis air (B_J). lakukan sampai 10 kali dan hitung rata-ratanya. Maka volume sebenarnya dari pipet tersebut dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Volume Pipet sesungguhnya} = (B_2 - B_1) \times BJ_s$$

Contoh:

Pipet yang akan dikalibrasi adalah pipet ukuran 10 ml

Berat wadah kosong (B_1) : 22,0391 g (22039,1 mg)

Berat wadah + air (B_2) : 31,9961g (31996,1 mg)

Berat Jenis air pada suhu kamar setempat (24°C) : 1,003771

Maka volume pipet sesungguhnya = $(31,9961 - 22039,1) \times 1,00371 = 9,9945 \text{ ml}$

Penyimpangan yang terjadi = $(10 - 9,9945) \times 100\% = 0,055\%$

$$\text{Volume Pipet sesungguhnya} = (B_2 - B_1) \times BJ_s$$

Batas penyimpangan yang masih diperbolehkan untuk pemeriksaan rutin dilaboratorium adalah 0,1%. Berarti untuk pipet 10 ml tidak boleh lebih dari 0,01 ml. apabila kesalahan > 0,1%, maka pipet tersebut tidak dapat digunakan atau boleh tetapi diperlukan nilai konversi sesuai besarnya penyimpangan.

2. Erlenmeyer

Erlenmeyer terbuat dari jenis gelas borosilikat. Erlenmeyer ada yang dilengkapi dengan tutup dan tanpa tutup yang terbuat dari kaca asah. Tutup/mulut Erlenmeyer berukuran standar, ada yang berukuran sedang dan ada yang lebar tergantung dari keperluan. Erlenmeyer dengan tutup asah digunakan untuk reaksi yang memerlukan pengocokan kuat, atau digunakan untuk titrasi, dihubungkan dengan alat ekstraksi, alat destilasi dan sebagainya. Sedangkan Erlenmeyer tanpa tutup asah digunakan untuk titrasi dengan pengocokan lemah. Erlenmeyer mempunyai kapasitas ukuran 25 – 2000 ml.

Perawatan

Erlenmeyer yang belum digunakan atau masih baru direndam dalam larutan HCl 2% selama 24 jam selanjutnya dicuci 2 kali dengan air kran dan bilas dengan aquades dan keringkan pada suhu kamar. Sedangkan yang sudah digunakan atau kotor sisa bahan yang terdapat dibuang kemudian dicuci dengan air mengalir menggunakan detergen, kemudian bilas dengan aquades, letakkan pada rak dengan posisi mulut disebelah bawah. Apabila

tidak segera dicuci harus direndam dalam air agar tidak mengering dalam keadaan kotor. Dalam pencucian bila memungkinkan dapat menggunakan sikat tabung.

Apabila Erlenmeyer terkontaminasi bahan yang sukar dihilangkan atau lemak terlebih dahulu direndam dalam larutan asam kuat atau korosif, misalnya larutan asam kromat atau asam sulfat berasap selama semalam. Selanjutnya dicuci seperti halnya pada Erlenmeyer yang kotor



3. Labu Takar/Labu ukur

Labu takar umumnya terbuat dari jenis gelas borosilikat. Labu takar mempunyai mulut labu dengan ukuran standar yang melengkapi dengan tutupnya. Tutup labu dapat terbuat dari gelas asah atau teflon. Labu takar mempunyai tipe gelas tidak berwarna (clear glass) dan berwarna (amber glass), labu takar tidak boleh dipanaskan. Labu takar mempunyai kapasitas volume 5 – 2000 ml.

Fungsi dari labu takar/labu ukur adalah

- a. Mengencerkan larutan dengan jumlah volume tertentu
- b. Membuat larutan dengan konsentrasi tertentu

Cara penggunaan labu takar/labu ukur yang benar yaitu :

- a. Bilaslah labu ukur dengan aquadest sebelum digunakan
- b. Ukurlah larutan/zat yang akan ditentukan konsentrasinya dengan pipet seukuran atau bahan/zat yang sudah ditimbang.
- c. Masukkan dengan teliti (kuantitatif) ke dalam labu ukur.

d. Tambahkan aquadest sedikit demi sedikit sambil dikocok dan tepatkan sehingga meniscus/garis batas. (Mahdi : 1982)

4. Beaker Glass



Gunanya untuk menyimpan, melarutkan, dan memanaskan larutan

5. Labu Didih

Gunanya untuk mendidihkan larutan terutama dipakai dalam alat-alat destilasi misalnya analisa protein

6. Buret

Buret berbentuk silinder, terbuat dari jenis gelas soda, borosilikat, amber. Mempunyai kapasitas 1 hingga 100 ml dengan pembangian skala 0,01 hingga 0,2 ml. Bentuk buret dibedakan buret dengan ujung kran lurus (burettes with straight stopcock) dan buret dengan ujung kran menyamping/bengkok (burettes with lateral stopcock). Kran buret terbuat dari gelas asah atau teflon.

Buret digunakan untuk memberikan secara tetes demi tetes sejumlah volume larutan yang diketahui dengan teliti pada proses titrasi. Buret sebelum digunakan harus bersih, kering bebas lemak. Sumbat kran tutup terbuat dari gelas asah atau teflon, Jika kran terbuat dari bahan teflon maka tidak diperlukan bahan pelicin, sedangkan kran gelas asah memerlukan sedikit pelumas untuk memudahkan putaran kran dan mencegah kebocoran.

Buret yang telah digunakan harus segera dicuci bersih dan dikeringkan terutama jika digunakan larutan titran alkali, karena akan mudah terjadi kerak pada kran yang akan menyebabkan tersumbatnya bagian jet atau

lubang pengalir/pancaran. Sebelum titrasi dimulai pastikan bahwa tidak terdapat gelembung gelembung udara dibawah kran dan titik-titik zat cair yang menempel pada dinding bagian dalam buret di atas garis miniskus larutan zat, karena akan menyebabkan kesalahan. Buret dibedakan menjadi : makro, semi mikro dan mikro buret.

Untuk membantu memudahkan pembacaan buret meniskus ada buret yang dilengkapi dengan latar belakang warna putih dengan pita garis biru dibalik dari pembagian skala buret, garis ini disebut sebagai garis Schellbach atau kadang-kadang disebut pula sebagai buret schellabach. Di laboratorium dikenal pula adanya buret otomatis (automatic burettes) yang dilengkapi dengan botol reservoir larutan standar, katub penyumbat yang dapat dirubah kedudukannya (katub berfungsi untuk mengalir larutan dari botol reservoir atau untuk menutup aliran). Selain itu ada juga yang disebut sebagai buret piston pada bagian alat potensiometer.

Cara menggunakan buret dan membaca buret.

- a. Sebelum digunakan kran buret harus ditutup
- b. Buret harus dibilas dengan aquadest, kemudian larutan baku atau larutan lain sebagai peniter.
- c. Isilah buret dengan larutan baku dengan menggunakan corong sampai melewati meniskus atas (angka 0).
- d. Keluarkan isi dalam buret dengan membuka kran buret sehingga tidak ada ruang kosong.
- e. Taruhlah kertas putih dibawah kran buret.
- f. Setelah buret terisi barulah dapat digunakan larutan dalam buret tersebut dengan jalan membuka kran buret.
- g. Pembacaan/ujung buret jangan sampai ada gelembung udara.
- h. Bacalah buret dengan tepat pada posisi mata lurus pada garis meniskus cairan. (mahdi 1982)

Latihan

1. Jelaskan cara mengkalibrasi pipet, volumetric dan Buret
2. Apakah perbedaan antara pipet takat dan pipet volumetric
3. Apakah fungsi dari labu ukur dan labu Erlenmeyer

BAB 3

ALAT STERILISASI

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui jenis jenis alat sterilisasi yang digunakan di laboratorium
2. Mengetahui alat alat sterilisasi yang digunakan di Laboratorium
3. Mengetahui cara pengoperasian alat sterilisasi
4. Mengetahui fungsi dari alat alat sterilisasi
5. Mengetahui cara perawatan dan pemeliharaan alat alat sterilisasi
6. Mengetahui tentang alat autoclave
7. Mengetahui tentang alat oven

B. Pendahuluan

Sterilisasi suatu produk bertujuan untuk mendapatkan suatu produk yang steril setelah melalui suatu proses sterilisasi dan diharapkan tidak mengalami perubahan kualitas. Oleh karena itu diperlukan pemilihan secara tepat sehingga dihasilkan suatu produk yang steril dengan kalitas yang baik.

Cara-cara Sterilisasi alat pada Laboratorium

1. Cara sterilisasi dengan pemanasan secara kering.

Pemanasan kering tersebut kurang efektif apabila temperatur kurang tinggi. Untuk mencapai efektivitas diperlukan pemanasan mencapai temperatur antara 160°C s/d 180°C. Pada temperatur tersebut akan menyebabkan kerusakan pada sel-sel hidup dan jaringan; hal tersebut disebabkan terjadinya auto oksidasi sehingga bakteri pathogen dapat terbakar. Pada sistem pemanasan kering terdapat udara; hal mana telah diketahui bahwa udara merupakan penghantar panas yang buruk sehingga sterilisasi melalui pemanasan kering memerlukan waktu cukup lama, rata-rata waktu yang diperlukan 45 menit. Pada temperatur 160°C memerlukan waktu 1 jam, sedangkan pada temperatur 180°C memerlukan waktu

30 menit. Pada Cara pemanasan kering tersebut secara rutin dipergunakan untuk mensterilisasikan peralatan-peralatan pipet, tabung reaksi, stick swab, jarum operasi, jarum suntik, syringe. Oleh karena temperatur tinggi sangat mempengaruhi ketajaman jarum atau gunting maka hindarilah tindakan sterilisasi dengan Cara panas kering terhadap jarum dan gunting.

2. Cara sterilisasi dengan radiasi.

Dalam mikro biologi radiasi gelombang cahaya yang banyak digunakan adalah pancaran cahaya ultraviolet, gamma atau sinar X dan cahaya matahari. cahaya matahari banyak mengandung cahaya ultraviolet, sehingga secara langsung dapat dipakai untuk proses sterilisasi; hal tersebut telah lama diketahui orang. cahaya ultraviolet bisa diperoleh dengan menggunakan katoda panas (emisi termis) yaitu ke dalam tabung katoda bertekanan rendah diisi dengan uap air raksa; panjang gelombang yang dihasilkan dalam proses tersebut biasanya dalam orde 2.500 s/d 2.600 Angstrom. Lampu merkuri yang banyak terpasang di jalan-jalan sesungguhnya banyak mengandung cahaya ultraviolet. Namun cahaya ultraviolet yang dihasilkan itu banyak diserap oleh tabung gelas yang dilaluinya, sehingga dalam proses sterilisasi hendaknya memperhatikan dosis ultraviolet.

Cahaya ultraviolet yang diserap oleh sel organisme yang hidup, khususnya oleh nukleotida maka elektron-elektron dan molekul sel hidup akan mendapat tambahan energi. Tambahan energi tersebut kadang-kadang cukup kuat untuk mengganggu bahkan merusak ikatan intramolekuler, seperti ikatan atom hidrogen dalam DNA. Perubahan intramolekuler tersebut menyebabkan kematian pada sel-sel tersebut. Beberapa plasma sangat peka terhadap cahaya ultraviolet sehingga mudah menjadi rusak. Cahaya gamma mempunyai tenaga yang lebih besar dan pada cahaya ultraviolet dan merupakan pancaran pengion. Interaksi antara cahaya gamma dengan materi biologis sangat tinggi sehingga mampu memukul elektron pada kulit atom sehingga menghasilkan pasangan ion (pair

production). Cairan sel baik intraselluler maupun ekstraselluler akan terionisasi sehingga menyebabkan kerusakan dan kematian pada mikro organisme tersebut. Sterilisasi dengan penyinaran cahaya gamma berdaya tinggi dipergunakan untuk objek-objek yang tertutup plastik (stick untuk swab, jarum suntik). Untuk makanan maupun obat-obatan tidak boleh menggunakan cahaya gamma untuk sterilisasi oleh karena akan terjadi perubahan struktur kimia pada makanan maupun obat-obatan tersebut.

3. Cara sterilisasi dengan pemanasan dengan uap air dan pengaruh tekanan (auto slave)

Benda yang akan disuci hamakan diletakkan di atas lempengan saringan dan tidak langsung mengenai air di bawahnya. Pemanasan dilakukan hingga air mendidih (diperkirakan pada suhu 100°C), pada tekanan 15 lb temperatur mencapai 121°C . Organisme yang tidak berspora dapat dimatikan dalam tempo 10 menit saja. Banyak jenis spora hanya dapat mati dengan pemanasan 100°C selama 30 menit tetapi ada beberapa jenis spora dapat bertahan pada temperatur tersebut selama beberapa jam. Spora-spora yang dapat bertahan selama 10 jam pada temperatur 100°C dapat dimatikan hanya dalam waktu 30 menit apabila air yang mendidih tersebut ditambah dengan natrium karbonat (Na_2CO_3).

4. Cara sterilisasi dengan pemanasan secara intermitten/terputus-putus.

John Tyndall (1877) memperoleh dari hasil penelitiannya bahwa pada temperatur didih (100°C) selama 1 jam tidak dapat mematikan semua mikroorganisme tetapi apabila air dididihkan berulang-ulang sampai lima kali dan setiap air mendidih istirahat berlangsung 1 menit akan sangat berhasil untuk mematikan kuman. Hal tersebut dapat dimengerti oleh karena dengan pemanasan intermitten lingkaran hidup pembentukan spora dapat diputuskan.

5. Cara-cara sterilisasi dengan incineration (pembakaran langsung).

Cara ini dilakukan pada peralatan-peralatan platina, khrome yang akan disteril dapat dilakukan melalui pembakaran • secara

langsung pada nyala lampu bunzen hingga mencapai inerah padam. Hanya saja dalam proses pembakaran langsung tersebut peralatan-peralatan tersebut lama kelamaan menjadi rusak. Keurtungannya: mikroorganisme akan hancur semuanya.

6. Cara-cara sterilisasi dengan filtrasi (filtration).

Cara filtrasi berbeda dengan cara pemanasan. Sterilisasi dengan Cara pemanasan dapat mematikan mikroorganisme tetapi mikroorganisme yang mati tetap berada pada material tersebut, sedangkan sterilisasi dengan Cara filtrasi mikroorganisme tetap hidur hanya dipisahkan dari material. Bahan filter/filtrasi adalah sejenis porselin yang berpori yang dibuat khusus dari masing-masing pabrik. Beberapa jenis filter yang biasa digunakan adalah : Filter Berkefeld V., Filter Coarse N, M dan W, Filter Fine, Filter Chamberland, Filter Seitz, Filter Sintered glass. Cara filtrasi tersebut hanya dipakai untuk sterilisasi larutan gula, cairan lainnya seperti serum atau sterilisasi hasil produksi mikroorganisme seperti enzim dan exotoxin dan untuk memisahkan filtrable virus dan bakteri dan organisme lainnya.

C. AUTOCLAVE

Autoklaf adalah sebuah alat yang digunakan untuk melakukan sterilisasi dengan memanfaatkan panas uap air di bawah tekanan. Temperatur panas uap air pada tekanan atmosfer hanya mencapai 100 °C. Akan tetapi, temperatur akan meningkat dengan adanya tekanan, misalnya pada tekanan 1 bar (kira-kira 15 lb/in²) temperatur menjadi 121°C. Bakteri akan dibunuh pada temperatur tersebut kurang lebih selama 15-20 menit (Collins & Lyne, 2004; Black, 2008). Autoklaf dapat digunakan untuk sterilisasi kultur media, jarum suntik, dan larutan yang termostabil (Cappuccino & Sherman, 2001).

Sterilisasi adalah suatu usaha untuk membebaskan alat-alat atau bahan-bahan dari segala macam bentuk kehidupan terutama mikroba. Seperti diketahui, penyelidikan suatu spesies mikroba selalu didasarkan atas penyelidikan sifat biakan murni spesies. Oleh karena itu, untuk dapat memisahkan kegiatan mikroba-mikroba satu dengan lainnya, atau untuk

memelihara suatu mikroba secara biakan murni, perlu dipergunakan alat-alat dan medium yang steril. Salah satu cara sterilisasi adalah sterilisasi dengan uap air panas bertekanan.

Autoklaf adalah alat untuk sterilisasi cara basah dengan menggunakan uap air jenuh yang bertekanan tinggi. Suhu yang digunakan biasanya diatas 100°C dan bisa mencapai 650°C . Alat ini terdiri atas suatu bejana tahan tekanan tinggi yang dilengkapi dengan manometer, thermometer dan klep pengatur suhu. Sterilisasi dengan autoklaf merupakan sterilisasi yang paling baik, jika dibandingkan dengan cara-cara sterilisasi lainnya. Dibuat dari bahan dengan konstruksi yang cukup kuat sehingga dapat menahan tekanan tinggi dan aman bagi pemakaian. Digunakan untuk sterilisasi media pembiakan, bahan-bahan atau alat-alat yang tidak rusak karena pemanasan dan tekanan tinggi, dan untuk destruksi media pembiakan.

Uap dibawah tekanan adalah agen sterilisasi yang paling efisien dan cara utama yang digunakan untuk mensterilkan pembalut peralatan, media dan barang-barang terkontaminasi. Suhu sterilisasi bergantung kepada tekanan uap. Biasanya suhu uap adalah 100°C , dan walaupun orang dapat mensterilkan pada suhu ini, akan diperlukan waktu sangat lama, mungkin berjam-jam. Namun apabila uap dibatasi dalam bejana yang tertutup, tekanannya akan naik, suhu uap akan naik dengan sebanding. Pada tekanan 15 pon setiap inci persegi ($1,05 \text{ Kg/cm}^2$) suhu uap mencapai 121°C , ini adalah suhu yang paling umum dipakai untuk sterilisasi.

Perlu dicatat bahwa apabila uap dikehendaki mencapai suhu yang diharapkan untuk tekanan yang sebanding (mis. 121°C dan tekanan 15 psi), atmosfer harus bebas udara dan hanya mengandung uap. Kondisi demikian ini dipenuhi dalam autoklaf, yang sebenarnya sama dengan panci bertekanan tinggi yang besar. Kebanyakan autoklaf dilengkapi dengan pengendali yang secara automatic membuang udara sebelum tekanan uap dapat meningkat sampai 15 psi. Namun pada autoklaf kecil, hal ini harus dilakukan secara manual dengan membuka katup sehingga uap mendesak udara keluar.

Sterilisasi dengan menggunakan autoklaf memiliki kisaran tekanan, waktu dan temperatur, tergantung material yang akan disterilisasi. Tekanan

yang dipakai pada alat autoklaf berkisar antara 15-20 lb, temperatur yang diizinkan berkisar antara 121-125 °C (250-256 °F), dan waktu yang dibutuhkan berkisar antara 15-45 menit, tergantung bahan atau material yang akan dimuat (Morello dkk., 2003). Udara juga merupakan faktor penting yang memengaruhi keefektifan alat autoklaf. Kehadiran udara pada muatan autoklaf akan memberi pengaruh kurang baik terhadap penetrasi panas uap air ke kultur media (Collins & Lyne, 2004).

Ada tiga jenis Autoclave yang umumnya digunakan

1. Gravity Displacement Autoclave

Pembeda antara jenis peralatan pada Autoclave terletak pada proses pengeluaran udara dari dalam Autoclave saat proses sterilisasi. Untuk Autoclave jenis ini memanfaatkan massa uap air yang ringan lalu dibandingkan dengan udara. Proses ini udara terletak dibawah uap air dengan memasukkan uap air dari atas Autoclave sehingga udara tertekan ke bawah dan keluar melalui saluran bawah Autoclave kemudian suhu meningkat dan terjadilah sterilisasi. Autoclave model ini bisa bekerja sampai suhu 121-134° dan dalam waktu 10-30 menit lamanya.

2. Prevacuum atau High Vacuum Autoclave

Autoclave jenis ini bekerja dengan proses pengeluaran udara selama 8 – 10 menit. Dengan dilengkapi alat tambahan berupa pompa yang mengevakuasi hampir semua udara dari dalam Autoclave dan membuat keadaan vacuum tercipta lalu uap dimasukkan ke dalam Autoclave. Akibatnya, uap akan segera melapisi seluruh permukaan benda, lalu suhu meningkat drastis dan terjadilah proses sterilisasi. Proses ini terjadi pada suhu 132-135 ° dalam waktu 3-4 menit.

3. Steam-flush Pressure-Pulse Autoclave

Jenis ini bekerja menggunakan aliran uap dan dorongan tekanan di atas tekanan pada atmosfer secara berulang – ulang. Waktu sterilisasinya tergantung pada benda yang akan di sterilisasi.

Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan pada Autoclave sebagai berikut:

- a. Dalam pengoperasiannya, autoklaf membutuhkan tenaga untuk bisa membuka dan menutup sekrup-sekrupnya.
- b. Pada pengoperasian autoklaf manual, suhu yang ditentukan kadang-kadang melewati batas.
- c. Udara yang ada dalam autoklaf belum dikeluarkan seluruhnya.
- d. Kurangnya pemahaman terhadap temperatur steril dan waktu sterilisasi.
- e. Pada saat suhu yang diinginkan sudah hampir sampai jangan tinggalkan autoklaf.
- f. Sebaiknya sebelum digunakan autoklaf dipanaskan dahulu ± 15 menit .
- g. Setiap menggunakan autoklaf harus mengetahui waktu sterilisasi tiap-tiap temperature steril.

Prinsip Kerja

Pada suhu 121°C , uap air berkondensasi pada bahan-bahan yang disterilkan, dilepaskan sebanyak 686 kalor pergram uap air. Panas ini mendenaturasikan atau mengkoagulasikan protein pada organisme hidup dan dengan demikian mematikannya.

Prosedur Kerja

a. AUTOCLAVE MANUAL



➤ Periksa volume air dalam Autoclave, pastikan tinggi air pada batas yang sudah ditentukan. Lebih baik menggunakan air hasil destilasi, untuk menghindari adanya kerat atau karat.

➤ Masukkan peralatan atau bahan, pastikan semua bagian alat peralatan terkenan air,

khususnya botol dengan tutup , buka tutupnya agara air bisa masuk

- Isi air secukupnya kedalam bejana.
- Pasang pemanas (nyalakan alat).
- Masukkan alat/bahan yang akan disterilkan kedalam bejana diatas rak logam yang berlubang, lalu autoklaf dikunci dan putar sekrup kuat-kuat.
- Buka pentil/katup pengaman sampai semua udara yang ada didalam bejana terusir keluar.
- Tutup katup pengaman dan biarkan sampai temperatur yang diinginkan
- Bila alat pengatur tekanan menunjukkan 15psi (*pounds per square inch*) atau 1atm, pertahankan pada posisi tersebut selama 15–20 menit.(15 psi=121 °C)
- Matikan dan biarkan sampai tekanan uap dalam autoklaf mendekati 0 psi.
- Keluarkan sisa uap yang tertinggal dalam autoklaf dengan cara membuka pentil/katup pengaman.
- Kendorkan mur, lepaskan sekrup-sekrupnya, buka dan angkat tutupnya lalu keluarkan bahan/alat yang sudah steril.

b. AUTOKLAF OTOMATIS



- Buka penutup autoklaf Masukkan bahan/alat yang akan disterilkan atau didestruksikan kedalam bejana dan jangan sampai melebihi kapasitas yang ditentukan, kunci penutup autoklaf.

- Masukkan program temperatur dan waktu yang diinginkan sesuai dengan bahan/alat yang disterilkan/didestruksikan.
- Setelah temperatur dan waktu yang diinginkan tercapai, alat secara otomatis akan mati.
- Tunggu sampai tekanan uap mendekati 0 psi, buka katup Exhaust (pembuang uap) dan keluarkan alat/bahan yang disterilkan/ didestruksikan.
- Buka katup Drain Valve (pembuang cairan) untuk mengeringkan air pada dasar autoklaf.

Berbagai Macam Kondisi Dalam Sterilisasi

Bahan	Volume	Waktu minimum (15psi)
Gelas botol/tabung	100ml	15 menit
Gelas botol/tabung	500ml	20 menit
Gelas botol/tabung	1000ml	25 menit
Gelas botol/tabung	2000ml	35 menit
Gelas botol/tabung	9000ml	55 menit
Bahan plastik		45 menit

Temperatur steril	Tekanan rata-rata (BAR)	Waktu minimum (menit)	Waktu keseluruhan (menit)
115	0,75	30	50
122	1,15	15	40
128	1,50	10	30
136	2,25	3	20

Perawatan Alat

1. Keringkan air pada dasar autoklaf setelah dioperasikan.
2. Jangan membuka katup pembuang uap sebelum tekanan dalam autoklaf mendekati 0 psi karena akan mengotori autoklaf dan benda-benda disekitarnya.
3. Lakukan uji keefektifan sterilisasi paling sedikit setiap minggu dengan memasukkan wadah endospora yang tahan panas pada waktu pengoperasian autoklaf.
4. Periksa apakah manometer, thermometer dan katup pembuang uap berfungsi dengan baik paling sedikit setiap minggu.

GAMBAR AUTOKLAF AUTOMATIC



D. OVEN



Sterilisasi panas kering adalah metode yang umum dan paling efektif digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas seperti cawan petri, pipet ukur dan labu erlenmeyer serta banyak alat-alat bedah. Dengan menggunakan oven sebagai alat sterilisasi kering, maka alat gelas yang disterilisasi tidak akan timbul kondensasi sehingga tidak ada tetes air (embun) di dalam alat gelas. Namun sterilisasi panas kering juga biasa digunakan untuk mensterilkan cairan dengan kadar air sangat rendah dan perawatan serbuk obat. Metode sterilisasi panas kering biasanya menggunakan Oven pensteril. Biasanya alat ini terbuat dari stainless steel, bentuk dan posisi elemen pemanas di ruang menjamin distribusi temperatur biasa. Keseluruhan proses terdiri dari pengeringan, pemanasan, sterilisasi dan pendinginan bertahap.

Oven merupakan alat yang digunakan untuk sterilisasi dengan menggunakan udara kering alat steril ini dipakai untuk mensterilkan alat-alat gelas seperti Erlenmeyer, petridis, tabung reaksi dan alat-alat gelas lainnya. Bahan-bahan seperti; kapas, kain dan kertas juga dapat disterilkan dengan alat ini, tetapi dalam batas-batas tertentu atau pada suhu tertentu saja. Pada umumnya temperatur yang digunakan pada sterilisasi secara kering adalah sekitar 170-180 °C selama paling sedikit 2 jam. Perlu diperhatikan bahwa lamanya sterilisasi tergantung pada jumlah alat-alat yang disterilkan dan ketahanan alat terhadap panas.

Oven adalah alat yang digunakan pula dalam melakukan sterilisasi. Berbeda dengan autoklaf, oven tidak memanfaatkan panas uap air untuk

melakukan sterilisasi. Oven dapat mensterilkan barang-barang dengan memanfaatkan aliran udara panas. Aliran udara panas tersebut didapatkan secara elektrik. Barang-barang yang disterilkan oleh oven antara lain cawan petri, labu erlenmeyer, pipet, dan objek metal (Collins & Lyne, 2004: 45). Barang pecah belah tersebut akan tergores dan rusak apabila diberikan panas uap air (Harley & Prescott, 2002).

Kelemahan sterilisasi menggunakan oven adalah waktu yang diperlukan untuk melakukan sterilisasi cukup lama, yaitu sekitar dua jam. Temperatur yang diizinkan untuk melakukan sterilisasi pada oven, berkisar antara 160-170 °C. Apabila lebih dari 180 °C, barang yang disterilisasi akan menjadi gosong (Harley & Prescott, 2002).

Latihan

1. Jelaskan fungsi autoclave
2. Jelaskan fungsi dari Oven
3. Apakah perbedaan sterilisasi menggunakan autoclave dengan oven
4. Bagaimanakah cara perawatan autoclave automatic

BAB 4

CENTRIFUGE

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui jenis jenis alat sentrifuge yang digunakan di laboratorium
2. Mengetahui cara pengoperasian alat sentrifuge yang digunakan di Laboratorium
3. Mengetahui cara pemeliharaan alat sentrifuge yang digunakan di Laboratorium

Sentrifugator adalah alat yang digunakan untuk mempelajari struktur dan fungsi suatu komponen sel. Prinsip kerjanya adalah dengan memisahkan atau memfraksionasi setiap komponen sel berdasarkan berat jenis dari tiap komponen sel. Alat tersebut memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan mengendap dan substansi yang lebih ringan akan berada di atas. Jika kecepatan sentrifugator semakin meningkat, komponen yang lebih ringan akan mengendap di dasar. Komponen sel yang mengendap disebut pellet, dan komponen sel yang tersuspensi di atasnya disebut supernatan. Pellet yang berhasil didapatkan nantinya akan dipelajari lebih lanjut untuk diketahui fungsinya (Campbell & Reece, 2009)

Defenisi



Alat untuk mengendapkan partikel-partikel suatu zat dengan cara memutar dengan kecepatan tinggi pada waktu tertentu.

Klasifikasi Alat centrifuge

Ada beberapa klasifikasi centrifuge menurut jenisnya, yang antara lain

1. General Purpose Centrifuge. Pada Model biasanya adalah tabletop (bisa diletakkan di atas meja) yang dirancang untuk pemisahan

sampel urine, serum atau cairan lain dari bahan padat yang tidak larut. Centrifuge ini biasanya berkecepatan 0-3000 rpm, dan bisa menampung sampel dari 5-100 ml.- Micro Centrifuge atau disebut juga microfuges, memutar microtubes khusus pada kecepatan tinggi. Volume micotubes berkisar 0.5-2.0 ml.

2. Speciality Centrifuge. Yaitu centrifuge yang dipakai untuk keperluan yang lebih spesifik. Seperti microhematocrit centrifuges dan blood bank centrifuges, yang dirancang untuk pemakaian spesifik di laboratorium klinik. Microhematocrit centrifuge adalah merupakan variasi dari microcentrifuge yang dapat menampung sampel kapiler untuk pengukuran volume hematocrit pack cell, sedangkan Blood Bank Centrifuge adalah centrifuge yang dipakai di bank darah dan serologi yang dirancang untuk memisahkan sampel serologis dalam tabung.
3. Jenis lain adalah centrifuge berkecepatan tinggi, yaitu ultracentrifuges dan refrigerated centrifuges . Centrifuge berkecepatan tinggi berputar pada kecepatan 0-20.000 rpm dan ultracentrifuge berputar pada kecepatan di atas 50.000 rpm. Kebanyakan centrifuge ini dilengkapi dengan sistem pendinginan untuk menjaga sampel tetap dingin selama sentrifugasi. Centrifuge ini lazim dipakai di laboratorium penelitian.

Kegunaannya:

- Mengendapkan partikel-partikel zat yang sukar mengendap.
- memisahkan partikel-partikel yang berlainan bobot jenisnya.
- Memisahkan komponen yang massanya mempunyai perbedaan sangat sedikit.

Prinsip Kerja

Prinsip kerja alat centrifuge adalah melawan gaya tarik bumi (Gravitasi) dengan kekuatan sentrifugal sehingga partikel yang larut dalam cairan akan terlempar keluar dari pusat putaran, dengan berat paling besar akan terlempar

lebih dahulu. Tenaga ini disebut *Relative Centrifugal Force* (RCF) dalam satuan *g* yang menggambarkan daya pemisah alat tersebut.

Jenis Centrifuge

1. Menurut alat pemutar yang digunakan:
 - a. Hand Centrifuge
 - b. Elektrik Centrifuge
2. Menurut Kecepatan:



a. Centrifuge dengan rotor jenis *swing-out*

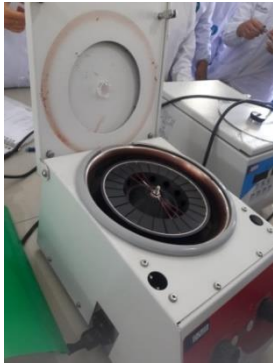
Centrifuge jenis ini memiliki selongsong tabung yang melekat secara bebas pada rotor sehingga apabila diputar, selongsong bersama tabung centrifuge di dalamnya akan berada pada posisi mendatar atau horizontal. Sedimen yang terbentuk padat dan datar, namun kecepatan putaran lebih rendah dibandingkan dengan jenis *angle* karena gesekan udara lebih besar.

b. Centrifuge dengan rotor jenis *angle* atau *fixed*



Centrifuge jenis ini memiliki selongsong tabung yang melekat secara tetap dengan sudut kemiringan 45° sehingga saat diputar posisi selongsong dan tabung didalamnya tetap dalam kemiringan tersebut. Sedimen yang terbentuk tidak sepadat sedimen jenis *swing-out* dan permukaan yang miring mengakibatkan mudah terurai kembali saat alat berhenti atau ketika tabung dikeluarkan. Kecepatan putaran lebih cepat karena gesekan udara lebih sedikit dibanding jenis *swing-out*. Jenis ini banyak digunakan di laboratorium rutin oleh karena ukurannya alat umumnya kecil dan pemakaian lebih untuk memperoleh supernatan bukan sedimen.

b. Ultracentrifuge (mikrocentrifuge)



Centrifuge ini memiliki kecepatan tinggi dan umumnya memakai rotor jenis *fixed* dan dilengkapi pendingin (*refrigerated*) karena gesekan pada kecepatan tinggi dapat meningkatkan suhu di dalam centrifuge sampai 5° C. Kecepatan mikrocentrifuge ini dapat mencapai 20.000 g atau 15.000 rpm. Salah satu contoh penggunaan centrifuge mikro di laboratorium rutin adalah untuk memisahkan lipoprotein atau kilomikron.

Bagian-Bagian Centrifuge

1. Rotor dan magnet ladam sebagai pemutar.
2. Poros motor berfungsi untuk meneruskan gerak (melingkar) rotor yang dilanjutkan ke pemegang tabung.
3. Tempat tabung centrifuge.
4. Lempeng penutup.
5. Tabung centrifuge ; tempat/wadah bahan yang akan diputar.
6. Pengatur kecepatan.
7. Sekring untuk pengaman arus listrik.
8. Tombol on/off.

Kecepatan Putaran

Pada umumnya centrifuge kecil yan sederhana mempunyai kecepatan per-menit (*revolutioan per minute*) antara 3000 – 5000 rpm yang dapat diatur menggunakan tombol pengatur kecepatan. Kecepatan sampai 20.000 g dapat diperoleh memakai ultracentrifuge atau mikrocentrifuge dengan pendingin. Namun paling baik mengukur dahulu kecepatan yang sebenarnya dari masing-masing alat centrifuge menggunakan rumus :

$$g = \text{radius rotor} \times \text{rpm}^2 \times 1,118 \times 10^{-5}$$

Radius : Panjang lengan rotor dari pusat tungkat pemutar (cm)

G : diketahui

Misalnya : r = 25 cm, g = 500 maka rpm = 1337

Penggunaan Secara Besar

Kecepatan pemusingan bahan darah yang diusulkan NCCLS adalah 1000 – 1200 g selama 5-15 menit, walaupun tidak ada kecepatan dan waktu standar yang ditetapkan khusus untuk darah atau serum. Untuk memperoleh hasil yang benar, sebaiknya menggunakan tabung yang sesuai dengan anjuran pabrik pembuat centrifuge. Hal ini terutama berlaku untuk jenis centrifuge khusus seperti mikrocentrifuge dan centrifuge berukuran besar atau berkecepatan tinggi. Untuk kecepatan di atas 5000 g perlu digunakan tabung polipropilen agar tidak pecah. Tabung yang digunakan harus sesuai dengan ukuran selongsong agar kedudukannya pas dan tidak boleh terlalu keluar.

Centrifuge tidak boleh dijalankan bila belum tertutup rapat atau dalam keadaan tabung belum seimbang. Tabung berukuran sama perlu didudukkan berhadapan dan untuk keseimbangan boleh menggunakan tabung berisis air. Jangan mengisi tabung sampai penuh tetapi sebaiknya hanya $\frac{3}{4}$ bagian saja. Sebaiknya menggunakan tabung tertutup atau tabung yang ditutup dengan parafilm. Apabila sewaktu dijalankan terdengar bunyi yang mencurigakan atau bunyi gesekan segera hentikan centrifuge untuk melihat kemungkinan pecahnya tabung.

Sewaktu menjalankan centrifuge, kecepatan harus dinaikkan secara bertahap dan tidak dibenarkan memasang pada kecepatan tinggi. Begitu pula sewaktu mematikan, centrifuge harus ditunggu sampai berhenti dan tidak dibenarkan memperlambat dengan tangan. Setelah berhenti, sebaiknya tutup tidak segera dibuka tetapi dibiarkan daulu sekitar 5 menit untuk terhindar infeksi oleh aerosol yang terbentuk selama pemusingan.

Perawatan dan Kalibrasi Centrifuge

Keseimbangan diperlukan sewaktu pemusingan karena apabila tidak seimbang akan terjadi getaran. Getaran ini akan semakin hebat pada saat terjadi percepatan dan perlambatan. Apabila hal ini terjadi selain mengakibatkan sedimen yang terbentuk terurai kembali juga akan

mempercepat rusaknya alat. Bagian dalam centrifuge dan selongsong tabung harus selalu dijaga kebersihannya. Sikat karbon (*brushes*) yang terdapat di bagian dalam alat harus diperiksa setiap 3 bulan sekali dan perlu diganti apabila terlihat haus.

Kecepatan putaran centrifuge harus diperiksa paling sedikit setiap 3 bulan sekali menggunakan alat yang disebut takometer. Takometer ada 2 macam yaitu, takometer kontak dan takometer optik atau fototakometer. Takometer kontak mengukur rpm dengan menempelkan alat ke bagian centrifuge yang sedang berputar, sedang fototakometer mengukur rpm berdasarkan pantulan permukaan yang sedang berputar. Agar permukaan mengeluarkan pantulan perlu diletakkan lapisan atau pita memantul (*reflective tape*). Kecepatan tidak boleh berbeda >5% dari rpm yang tertera.

Apabila centrifuge memiliki pengatur waktu perlu diperiksa secara berkala dengan *stopwatch* dan tidak boleh berbeda >10%. Centrifuge dengan pendingin (*refrigerated*) perlu diperiksa suhunya setiap bulan sekali dan tidak boleh berkisar >2°C dari suhu yang diharuskan. Pada dasarnya, prinsip kerja sentrifus (centrifuge) adalah melawan arah gaya tarik bumi (gravitasi) dan sedimentasi. Dengan adanya percepatan gaya sentripetal dan kekuatan gaya sentrifugal membuat objek terbentuk sedimentasi menjadi beberapa fase: supernatan dan pellet.

Partikel yang terlarut dalam objek akan terpelantai keluar dari pusat putaran berdasarkan pada perbedaan massa jenis. Dimana partikel yang kurang padat akan mengungsi dan pindah ke pusat. Dengan adanya percepatan radial, membuat partikel padat pada objek yang ditaruh dalam microtube di sentrifus (centrifuge) akan mengendap.

Standarisasi Penggunaan Sentrifus (Centrifuge)

1. Dalam pemakaian sentrifus (centrifuge), sebaiknya menggunakan tabung atau microtube yang sesuai dengan anjuran pabrik sentrifuse (centrifuge). Terutama dalam pemakaian untuk jenis sentrifus berkecepatan tinggi atau microcentrifuge.

2. Untuk sentrifus (centrifuge) yang memiliki kecepatan rotasi diatas 5000 g, maka diperlukan tabung berbahan polipropilen agar tidak pecah. Memiliki ukuran yang sesuai dan pas dengan selongsong pada sentrifus (centrifuge) atau bisa menggunakan adaptor sentrifus (centrifuge).
3. Pastikan posisi tabung dalam selongsong sentrifus (centrifuge) seimbang dan berkedudukan saling berhadapan.
4. Sentrifus tidak boleh dioperasikan jika belum tertutup rapat dan kedudukan tabung dalam selongsong belum seimbang.
5. Selama sentrifugasi, keseimbangan diperlukan untuk meminimalisir terjadinya getaran. Pada saat rotor berputar, frekuensi getaran akan semakin kuat jika kedudukan tabung dalam selongsong tidak seimbang. Hal tersebut dapat mengganggu pembentukan dan sedimen yang terbentuk menjadi rentan terurai kembali. Pada tingkat lanjut, akan menyebabkan alat cepat rusak.
6. Jangan mengisi tabung sampai penuh, setidaknya sisakan sekitar $\frac{1}{4}$ bagian. Hal ini dimaksudkan agar saat rotor berputar dengan kecepatan maksimal, tekanan volume objek dalam tabung tidak sampai mendesak tutup tabung yang dapat berakibat fatal.
7. Setelah pemakaian sentrifus selesai, pastikan alat benar-benar berhenti. Sebaiknya Anda tidak langsung membuka tutup sentrifus. Diamkan terlebih dahulu sekitar 5 menit untuk menjaga agar tidak terkontaminasi atau terkena percikan aerosol yang terbentuk selama sentrifugasi.

Latihan

1. Jelaskan bagian-bagian dari sentrifuge
2. Jelaskan cara perawatan dan kalibrasi dari sentrifuge
3. Jelaskan kegunaan dari sentrifuge
4. Jelaskan prinsip kerja dari sentrifuge

BAB 5

FOTOMETER

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui jenis jenis fotometer yang digunakan di laboratorium
2. Mengetahui cara pengoperasian fotometer yang digunakan di Laboratorium
3. Mengetahui cara pemeliharaan/perawatan alat fotometer yang digunakan di Laboratorium

B. Pendahuluan

Fotometer merupakan peralatan dasar di laboratorium klinik untuk mengukur intensitas atau kekuatan cahaya suatu larutan. Sebagian besar laboratorium klinik menggunakan alat ini karena alat ini dapat menentukan kadar suatu bahan didalam cairan tubuh seperti serum atau plasma. Polarimetri adalah metode yang digunakan untuk analisis komponen menggunakan polarimeter.

Fotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur pencahayaan atau penyinaran. Seperti penerapan di fotometry industri, suatu "fotometer" adalah kata umum yang meliputi alat-alat untuk mendeteksi:

- intensitas cahaya hamburan
- penyerapan
- fluoresensi

Kebanyakan fotometer berlandaskan pada sebuah fotoresistor atau fotodioda. Masing-masing mengalami perubahan sifat kelistrikan ketika disinari cahaya, yang selanjutnya dapat dideteksi dengan suatu rangkaian elektronik tertentu.

1. Jenis-Jenis Fotometer

- Absorption
- Fotometer
- Flame-fotometer

- Fluorometer
- Nefelometer
- Atomik spectrometer

2. Spesifikasi Fotometer

Terdapat 2 jenis fotometer, fotometer portabel dan non portabel. Berikut ini jenis-jenis fotometer portabel yang sederhana tetapi sangat akurat iluminansi L201/Lux meter, dengan sistem khusus seperti fluks bercahaya dan pengukuran fotometer.

a. Pencahayaan L201 photometer



Fotometer iluminansi L201 menawarkan biaya yang lebih rendah ditambah dengan akurasi yang tinggi iluminansi photopic detektor. Rentang operasi 0-19,999 Lux membuat L201 cocok untuk kantor dalam ruangan dan aplikasi pencahayaan industri rentang

pengukuran lain yang tersedia termasuk kalibrasi footcandles.

b. L202 Pencahayaan dan Fotometer Luminance

L202 radiometer digital sangat dirancang untuk pengukuran akurat dari iluminansi dan terang layar dengan biaya rendah dan telah digunakan secara luas oleh para insinyur sistem medis di seluruh dunia. Dengan sederhana, fungsi langsung dan dirancang dengan user dalam pikiran, operasi seperti otomatis sensing dan kalibrasi detektor dipilih kepala berarti bahwa meter memiliki aplikasi ke setiap daerah membutuhkan handal, terjangkau, pengukuran mudah.

c. L203 Pencahayaan dan Fotometer Luminance

L203 disediakan dengan aksesoris untuk kedua dan pencahayaan pengukuran pencahayaan. Dengan rentang pengukuran besar ,001-199 990 fotometer ini cocok untuk berbagai aplikasi termasuk dalam keadaan darurat. Fitur utama termasuk otomatis atau manual mulai, LCD backlight display, beralih antara Lux dan footcandle atau cd /

dan footLambert, RS232 interface rata-rata, m² dan integrasi, minimum dan nilai maksimum.

d. Luminous Flux Fotometer

Luminous Flux Fotometer terdiri dari segi seri L203 dan L300 fotometer dengan mengintegrasikan dan detektor fotopic. Aplikasi untuk pengukuran fluks bercahaya termasuk dan miniatur lampu otomotif, LED dan sumber dipandu ringan seperti dan endoskopi iluminator mikroskop.

e. Spot Mengukur Aksesori

Aplikasi yang memerlukan pengukuran pencahayaan pada area kecil, sumber kecil atau sumber-sumber jauh membutuhkan penambahan titik pengukuran aksesori dipasang untuk photopic detektor fotometer tersebut. SMU 203 memiliki pilihan 25mm-50m dan 100mm 'C' mount lensa dan tabung ekstensi memberikan berbagai ukuran spot dan bidang pandang.

f. L300 Fotometer

Sero L300 dirancang untuk aplikasi yang memerlukan pengukuran kontinuitas lokasi tetap. Fotometer ini telah diganti oleh fotometer L203.

g. L103 Fotometer

Fotometer ini diproduksi sebelum Januari 1999 dan sekarang telah diganti dengan L202, L201 dan L203 seri fotometers. Fotometer ini memiliki berbagai penguat dengan pembacaan skala penuh dari 1.999 Lux atau cd / m² sampai dengan 199 900 Lux atau cd / m².

h. L101 Fotometer

Fotometer L101 secara khusus diproduksi untuk mengukur iluminansi dan pencahayaan L202 dan fotometer pencahayaan.

3. Fotometer non portabel terbagi menjadi 4 macam, diantaranya:

a. Spektrum Optik Reflectance Fotometri

Fotometri ini mengukur permukaan sebagai fungsi panjang gelombang. Caranya, permukaan diterangi dengan cahaya putih, dan cahaya pantulan diukur setelah melewati sebuah

monokromator. Jenis pengukuran telah terutama aplikasi praktis, misalnya dalam industri cat ciri warna permukaan obyektif.

b. UV dan Cahaya Tampak Transmisi Fotometri

Alat ini digunakan untuk pengukuran penyerapan cahaya panjang gelombang tertentu (atau suatu jangkauan panjang gelombang) dari zat warna dalam larutan. Berdasarkan hukum Beer konsentrasi zat warna dalam larutan dapat dihitung. Karena berbagai aplikasi telah ada dalam satu alat fotometer ini. Panjang gelombang yang dipancarkan dalam larutan berkisar antara 240-750 nm.

c. Inframerah Transmisi Cahaya Fotometri

Fotometri dalam cahaya inframerah terutama digunakan untuk mempelajari struktur zat, sebagai contoh dikelompokkan daya serap larutan pada panjang gelombang tertentu. Pengukuran dalam larutan ini umumnya tidak mungkin, karena air dapat menyerap sinar inframerah dengan sangat kuat dalam beberapa rentang panjang gelombang. Oleh karena itu, fotometer inframerah baik digunakan dalam fase gas atau dengan menekan zat tablet bersama-sama dengan garam yang transparan dalam rentang inframerah.

d. Atom Penyerapan Fotometri

Fotometri penyerapan atom adalah fotometer yang mengukur cahaya api yang sangat panas. Sampel untuk analisa disuntikan ke dalam api konstan dengan laju diketahui. Logam dalam larutan yang hadir dalam bentuk atom dalam nyala. Cahaya yang monokromatik dalam photometer jenis ini dihasilkan oleh sebuah lampu pengosongan tempat pembuangan terjadi dalam gas dengan metal akan ditentukan. Pembuangan kemudian memancarkan cahaya dengan panjang gelombang yang sesuai dengan garis spektrum dari logam. Filter dapat digunakan untuk mengisolasi salah satu garis spektrum utama dari logam yang akan dianalisis. Cahaya yang diserap oleh logam dalam api, dan

penyerapan digunakan untuk menentukan konsentrasi logam dalam larutan asli.

4. Cara Pengoprasian Alat

Dipastikan kuvet telah terpasang dan pompa peristaltik telah dilinkari selang. Kabel dihubungkan dengan arus listrik 220 V. Tombol On/Off ditekan untuk menghidupkan alat dan diamankan 10 menit untuk warming up. Sampel disedot dengan menekan tombol aspirator. Metode yang digunakan dipilih pada touch screen. Semua pengaturan yang kemudian diatur. Semua pengaturan yang digunakan diatur. Hasil analisis dicetak dan sampel yang telah diuji dibuang. Selang dari pompa peristaltik dilepas. Alat dibilas dengan aquabides sebanyak 10 kali dan desinfektan 10%. Sisa buangan dikeluarkan dengan mengalirkan udara. Selang dilepas dari pompa, alat dibersihkan dengan menggunakan tissue, tekan tombol On/Off untuk mematikan alat. Kabel dilepas dari sumber arus. Tutup alat agar tidak terkena debu.

C. *Spektrofotometer.*

Spektrofotometer adalah cabang analisis instrumen yang mencakup seluruh metoda pengukuran berdasarkan interaksi antara suatu spektrum sinar elektromagnetik (REM) dengan larutan molekul atau atom. Spektrofotometer adalah suatu instrumen untuk mengukur transmittans atau absorbance dari suatu contoh sebagai fungsi dari panjang gelombang. Berdasarkan pada berkas sinar yang digunakan dikenal spektrofotometer berkas tunggal dan spektrofotometer berkas rangkap.

Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu obyek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet. Sebagian dari cahaya akan diserap dan sisanya akan dilewatkan.

Prinsip kerja alat spectrophotometer yaitu cahaya dari sumber cahaya yang masuk ke monokromator dan didispersikan menjadi cahaya monokromatis. Cahaya monokromatis ditransmisikan melalui sel sampel dalam tempat sampel dan jatuh pada detector, kemudian dikonversikan sinyal listrik yang memperkuat dan tercatat pada rekorder.

Berdasarkan panjang gelombang yang digunakan ada dua spektrofotometer yaitu:

1. Spektrofotometer UV – VIS untuk daerah di atas UV dan Visibel
2. Spektrofotometer infra merah

Spektrofotometer spectronic-20 adalah spektrofotometer yang dapat digunakan untuk mengukur serapan sinar tampak oleh suatu materi dalam bentuk larutannya. Jumlah cahaya yang diserap oleh suatu zat dalam larutannya sebanding dengan konsentrasi zat dalam larutannya. Hubungan antara serapan cahaya dengan konsentrasi zat dalam larutan dinyatakan oleh persamaan Lambert-Beer berikut ini:

$$A = - \log T = \epsilon b c$$

Dimana A = absorbance ϵ = absorptivitas molar ; $L \text{ cm}^{-1}, \text{ mol}^{-1}$

b = panjang sel, cm c = konsentrasi zat yang menyerap sinar,
Mol/L

Komponen yang penting dari suatu spektrofotometer adalah sebagai berikut:

1. Suatu sumber energi cahaya yang berkesinambungan yang meliputi daerah spektrum dalam mana instrumen itu dirancang untuk beroperasi.
2. Suatu monokromator, yakni suatu piranti untuk memencilkan pita sempit panjang-panjang gelombang dari spektrum lebar yang dipancarkan oleh sumber cahaya.
3. Suatu wadah untuk sampel.
4. Suatu detektor, yang berupa transduser yang mengubah energi cahaya menjadi suatu isyarat listrik.
5. Suatu penganda (amplifier) dan rangkaian yang berkaitan yang membuat isyarat listrik itu memadai untuk dibaca.
6. Suatu sistem baca pada mana diperagakan besarnya isyarat listrik.

Rentang panjang gelombang yang dapat terukur oleh spectronic-20 adalah antara 340 nm sampai dengan 600 nm dan termasuk jenis spektrofotometer berkas sinar tunggal (single beam). Dengan kata lain hanya senyawa berwarna yang dapat diukur serapannya dengan alat ini. Dengan spektrofotometer, penentuan konsentrasi suatu senyawa dilakukan

dengan membandingkan kekuatan serapan cahaya oleh suatu standar yang telah diketahui konsentrasinya. (Hendayana Sumar dkk :2001)

Benda bercahaya seperti matahari atau suatu bohlam listrik memancarkan spektrum yang lebar yang terdiri dari panjang gelombang. Panjang gelombang yang dikaitkan dengan cahaya tampak itu mampu mempengaruhi selaput pelangi mata manusia dan karenanya menimbulkan kesan subyektif akan ketampakan (vision). Untuk daerah ultraviolet dan infra merah dari spektrum yang terletak dikiri dan dikanan daerah tampak. Dalam daerah tampak, manusia dengan ketampakan warna yang normal dapat mengkorelasikan panjang gelombang cahaya yang mengenai mata dengan indra subyektif mengenai warna.

5. *Energi gelombang*

Energi gelombang seperti bunyi dan air ditentukan oleh amplitudo dari getaran (misal tinggi gelombang air) tetapi dalam radiasi elektromagnetik energi ditentukan oleh frekuensi, dan quantized, terjadi hanya pada tingkatan tertentu :

$$E = h \nu$$

dimana : h = konstanta Planck, $6,63 \times 10^{-34}$ J.s

Spektrum tampak dan warna warna komplementer

Panjang gelombang Nanometer (nm)	Warna	Warna komplementer
440 – 435	Lembayung (v)	Kuning-hijau
435 – 480	Biru	Kuning
480 – 490	Hijau-biru	Jingga
490 – 500	Biru-hijau	merah
500 – 560	Hijau	Ungu
560 – 580	Kuning-hijau	Lembayung
580 – 595	Kuning	Biru
595 – 610	Jingga	Hijau-biru
610 – 750	Merah	Biru-hijau

Bagian bagian penting spectronic-20 dan fungsinya adalah sebagai berikut:

- a. Power switch/zero control berfungsi untuk menghidupkan alat dan mengatur posisi jarum penunjuk (meter) pada angka 0,00 % T pada saat sample compartment kosong dan ditutup.
- b. Transmittance/absorbance control, berfungsi untuk mengatur posisi jarum meter pada angka 100 % T pada saat kuvet yang berisi larutan blanko berada dalam sample compartment dan ditutup.
- c. Sample compartment berfungsi untuk menempatkan larutan dalam kuvet pada saat pengukuran selama pembacaan, sample compartment harus dalam keadaan tertutup.
- d. Wavelength control berfungsi untuk mengatur panjang gelombang yang dikehendaki yang terbaca melalui cendela sebelahny.
- e. Pilot lamp (nyala) berfungsi untuk mengetahui kesiapan instrument.
- f. Meter berfungsi untuk membaca posisi jarum penunjuk absorbansi dan atau transmittance

6. Warna

Persepsi visual tentang warna dibangkitkan dari penyerapan selektif panjang gelombang tertentu pada peristiwa penyinaran obyek berwarna. Sisa panjang gelombang dapat diteruskan (oleh obyek transparan) atau dipantulkan (oleh obyek yang buram) dan dilihat oleh mata sebagai warna dari pancaran atau pantulan cahaya. Oleh karena itu obyek biru tampak berwarna biru sebab telah menyerap sebagian dari panjang gelombang dari cahaya dari daerah oranye-merah. Sedangkan obyek yang merah tampak merah sebab telah menyerap sebagian dari panjang gelombang dari daerah ultraviolet-biru.

Bagaimanapun, di dalam spektrometri molekul tidak berkaitan dengan warna dari suatu senyawa, yaitu warna yang dipancarkan atau pantulkan, namun berkaitan dengan warna yang telah dipindahkan dari spektrum, seperti panjang gelombang yang telah diserap oleh suatu unsur di dalam suatu larutan.

7. Absorpsi radiasi oleh Molekul

Pada daerah sinar ultraviolet dan sinar tampak, energi diperoleh dari transisi elektronik. Energi yang diserap oleh molekul digunakan untuk menaikkan energi elektron dari keadaan dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Transisi elektron secara umum terjadi antara orbital ikatan (bonding) atau lonepair dengan orbital anti ikatan (anti-bonding) tak terisi. Penyerapan dari panjang gelombang tersebut kemudian menjadi ukuran dari pemisahan tingkat energi dari orbital-orbital terkait.

Eksitasi dari elektron diikuti oleh perubahan vibrasi dan rotasi nomor kuantum sedemikian hingga yang terjadi adalah suatu penyerapan menjadi suatu puncak yang lebar, yang berisi vibrasi dan rotasi. Dalam kaitan dengan interaksi dari solut dengan molekul bahan pelarut ini adalah pada umumnya dikaburkan, dan diamati sebagai kurva halus. Dalam fase uap, dalam bahan pelarut non-polar, dan dengan puncak tertentu misalnya benzene dengan pita 260 nm), vibrasi struktur halus terkadang teramati

Pada daerah sinar inframerah (2.500 -1.5000 nm atau 2,5-15µm) energi diserap oleh vibrasi atau rotasi pada bagian tertentu dari molekul. Hukum Lambert; yang menghubungkan ketebalan dari sel sampel (kuvet) pada perbandingan kekuatan radiasi berkas cahaya yang masuk dan berkas cahaya yang keluar, dan menyatakan “Ketika radiasi monokromatik lewat melalui suatu medium yang transparan yang berisi suatu unsur absorbing, tingkat penurunan kekuatan radiasi dengan ketebalan dari medium adalah setara dengan kekuatan radian dari suatu radiasi “

Dengan alasan yang sama, untuk perubahan penambahan konsentrasi dari unsur absorbing, dc ,

$$\ln \frac{I}{I_0} = -k'c$$

Hukum ini disebut Hukum Lambert-Beer, dan berlaku untuk unsur yang menyerap cahaya dengan menghubungkan konsentrasi dari jenis absorbing pada perbandingan kekuatan radiant berkas cahaya yang

masuk dan yang keluar. Hukum Lambert dan Hukum Lambert-Beer biasanya dikombinasikan dalam suatu hubungan tunggal sebagai dasar untuk semua penentuan kuantitatif.

8. **Sumber cahaya**

- Tegangan listrik harus stabil
- Panaskan lampu terlebih dahulu selama 5-10 menit (tergantung dari jenis alat)
- Jangan menghidupkan dan mematikan alat berkali-kali dalam waktu singkat karena lampu dapat terbakar.
- Pada beberapa spektrofotometer, posisi harus diatur ulang setelah kita mengganti lampu. Posisi lampu sedemikian rupa sehingga didapatkan % T maksimal (100 %) atau A Minimum (0).
- Jangan menyentuh dengan tangan karena lemak dari tangan melekat akan menimbulkan bekas yang sulit dihilangkan bila tersentuh waktu mengganti lampu segera bersihkan dengan alkohol.
- Apabila alat dapat menunjukkan % T maksimum atau minimum ini berarti terjadi kelemahan pada lampu atau posisi yang tidak tepat.

9. **Selector Panjang Gelombang (Monokromator)**

- Permukaan gratting tidak boleh disentuh , apabila dibersihkan sebab setiap sentuhan akan merusak alur pada permukaan.
- Satu-satunya pemeliharaan gratting yaitu dengan menjauhkan dari debu dan kelembaban.
- Bila gratting menjadi kotor dan ditimbuni jamur maka harus di ganti dengan yang baru
- Cermin yang bercoating dapat di bersihkan permukaannya dengan kretas lensa yang di beri alkohol secara perlahan-lahan.
- Sedapat mungkin jangan merubah posisi cermin waktu membersihkannya.
- Pada fotometer dipakai filter sebagai monokromator biasanya tersedia satu set fiter dengan panjangf gelombang tertentu.
- Filter jarang rusak tetapi dapat berjamur

Apabila filter di timbuni jamur yang masih tipis , maka permukaan filter harus dipoles dengan pasta gigi tetapi bila tebal maka harus dipoles dengan alat atau di ganti dengan yang baru.

10. **Kuvet (tempat sampel)**

Permukaan *kuvet* yang dilewati oleh sinar harus sangat bersih dan tidak boleh dipegang tangan. *Kuvet* dicuci dengan air beberapa kali dibilas dengan *aquadest* dan kuvet tidak boleh dibersihkan dengan *ether* atau *aceton* , karena bahan tersebut mengandung lemak yang dapat tertinggal dalam kuvet. Untuk membersihkan permukaan kuvet dapat dipergunakan kertas spesial yang bersih.

11. **Detektor**

Detektor yang biasa digunakan spektrofotometer adalah *fotomultiplayer tube*, *fotoceell* atau *fotodioedo*.

Pemeliharaanya yaitu untuk:

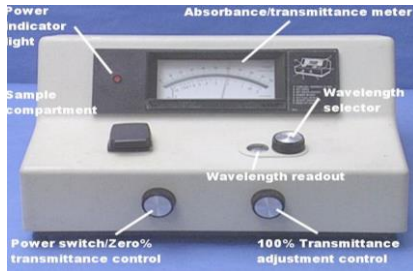
- Untuk *fotomultiplayer* harus diperhatikan agar tidak terkena cahaya ruangan pada saat alat dalam keadaan hidup karena dapat segera rusak.
- Alat yang menggunakan *fotomultiplayer* harus dihidupkan beberapa jam dalam seminggu walaupun tidak dipakai karena yang tidak dihidupkan selama beberapa bulan akan memperbesar dari current sehingga tidak dapat menunjukkan 0%.

12. **Rekorder**

- Simpan alat ditempat sejuk, selimuti alat dengan penutup untuk menghindari debu.
- Secara berkala bersihkan cermin dan bagian dalam instrum optis alat dengan kertas penghisap atau kain khusus untuk cermin(misalnya satu kali dalam sebulan).
- Jangan terlalu sering memetik dan menghidupkan alat.
- Untuk jenis lampu (sumber sinar) tentu memiliki waktu pakai tertentu, maka sebelum habis waktu pakai tersebut harus menyiapkan cadangan.
- Jangan terlalu takut mempelajari seluk beluk komponen alat.

- Untuk instrumen lain yang memakai *analog* digital dan priter maka harus dihindarkan dari semut dan debu yang dapat merusak rangkaian elektriknya.

13. Cara pengoperasian spectronic -20



Pada alat ini digunakan lampu tungsten sebagai sumber cahaya. Cahaya dari sumber cahaya dilewatkan pada prisma atau grating untuk memperoleh cahaya yang monokromatis. Cahaya monokromatis selanjutnya

diteruskan melewati larutan (sel) setelah melalui slit (celah). Bagian cahaya yang tidak diserap oleh larutan diteruskan ke detector

Untuk mengoperasikan alat spectronic -20 adalah sebagai berikut :

- Hubungkan alat dengan stabilisator tegangan. Nyalakan alat dengan memutar tombol ON (berfungsi rangkap untuk kalibrasi 0 % T). Biarkan alat panas selama 15 menit.
- Pilihlah panjang gelombang yang akan digunakan dengan memutar tombol wavelength selector. Lakukan kalibrasi 0,00 %T dengan memutar tombol power switch.
- Masukkan larutan blanko kedalam tempat sel, pasang kuvet yang berisi larutan blanko kedalam sample compartment dengan tepat dan tutup. Atur harga transmittansi menjadi 100% T dengan tombol transmittance/ absorbance control.
- Ganti kuvet yang berisi larutan blanko dengan kuvet larutan standar/sampel dan pasang ke dalam sample compartment dan tutup. Baca transmittansi/absorbansi pada skala meter. (Suyanta dkk : 2000).

14. Kesalahan dalam Analisis Spektrometri Kuantitatif

Ada tiga sumber kesalahan dalam pengukuran dengan spektrofotometer :

- a. pengaturan ke absorbansi nol (100% T)
- b. pengaturan ke absorbansi ∞ (0% T)
- c. pembacaan nilai absorbansi atau transmittans

15. Pemeliharaan dan perawatan

Setiap sesudah digunakan dibilas dengan aquabides serta dihindari dari pelarut yang bersifat korosif. Lampu halogen dimatikan setiap setelah digunakan. Pembersih yang digunakan dapat berupa campuran detergen, alkohol dan air atau menggunakan sodium hipoklorit. Perawatan alat dilakukan dengan cara alat disimpan pada meja permanen. Tujuannya adalah agar alat tidak terkena guncangan dan mengurangi efektivitas kerja alat. Alat disimpan di tempat yang bersih, tidak boleh terkena cahaya matahari langsung dan hindari kontak atau berdekatan dengan alat yang mengeluarkan gelombang magnetik seperti TV, radio dan handphone.

D. Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) atau AAS



Spektrofotometer Serapan Atom (SSA/AAS) adalah alat yang digunakan untuk pemeriksaan kadar logam yang mempunyai akurat lebih tinggi dan cepat. Spektrofotometer serapan atom terdiri dari garis-

garis yang jauh lebih tajam dari pada pita-pita yang diamati dalam spektroskopi molekuler. Serapan atom telah dikenal bertahun-tahun yang lalu. Misalnya : Garis-garis gelap frekuensi tertentu pada spektrum matahari yang tanpa garis itu akan sinambung.

Pertama kali diperhatikan oleh Wolwaston dalam tahun 1802, garis-garis ini ditemukan ulang dan dipelajari lebih mendalam oleh Joseph Von Fraunhofer dan diberi nama garis-garis Fraunhofer. Pentingnya garis-garis ini baru dipahami tahun 1859, ketika Krichoff menerangkan asal-usulnya setelah mengamati gejala serupa di laboratorium.

Permukaan matahari yang nampak jauh lebih panas dari pada selimut gas yang mengitari dan atom-atom dalam atmosfer menyerap frekuensi-frekuensi yang khas dalam kontinum pancaran (dari) permukaan lebih panas radiasi itu dipancarkan kembali, namun pancaran itu berlangsung ke segala arah. Kirchoff dan lain-lainnya, terutama Bunsen (yang terkenal dengan pembakarannya itu) mengidentifikasi sejumlah unsur dalam

atmosfer matahari dengan membandingkan frekuensi garis-garis dari unsur-unsur yang dikenal di laboratorium.

Prinsip kerja :

Yang diukur adalah serapan atom, pengukuran cahaya yang lolos pada saat atomisasi (pembakaran) dengan api pada suhu 1000°C - 1200°C (warna biru). Logam atom menyerap cahaya, ada yang lolos dimasukkan di CPU (Central Prosesor Unit) energi yang lolos diproses dan dihitung.

Semakin banyak yang lolos makin kurang pula kadarnya semakin sedikit cahaya yang lolos makin tinggi kadarnya dalam mengukur larutan.

Komponen-Komponen spektrofotometer serapan atom.

1. Sumber energi.
Sumber energi cahaya yang berkesinambungan yang meliputi daerah spektrum dalam instrumen dirancang untuk beroperasi.
2. Monokromator .
Suatu prinsi untuk mengecilkan pita panjang gelombang dari spektrum lebar yang di pancarkan oleh sumber cahaya.
3. Suatu wadah untuk sampel .
4. Detektor .
Transduser yang mengubah energi cahaya yang menjadi suatu energi listrik.
5. Suatu pengganda (Amplifier) membuat isyarat listrik agar mudah dibrer.
6. Lampu spektrum kontinyu.
Lampu wolfram (lampu pijar biasa) terdiri atas sebuah bola gelas yang di vakumkan.dalam bola tersebut ada kawat wolfram yang di panaskan dengan arus elektrik dan A,mencapai suhu 2000 K yang memancarkan spektrum kontinyu .apabila suhu kawat pijar dinaikkan dalam spektrum akan terjadi pergeseran intensitas maximum kearah jarak gelombang yang lebih pendek.
7. Lampu Nerst
Kawat pijar lampu ini dibuat dari silisium karbida dan dipanaskan sampai KL 1`500 K .kawat pijarnya dibuat dari

campuran zirkonioksida (38%) 1 triumoksida 30% dan Erbiumoksida 3%, kawasan gelombangnya terletak antara 0,4 dan 20 μm .

8. Lampu Nikbrom.

Terdiri atas sepotong pita Nikelkhrom yang dipanaskan sampai 2000 K . kawasan gelombangnya juga terletak antara 0,4 dan 20 μm . Sumber yang paling meluas dalam serapan atom adalah tabung discas berkatode berongga seperti aslinya direkomendasikan oleh walsh. Tabung ini berisi sebuah katode silindris yang berongga, dan berisi gas lamban, seringkali neon atau Argon. Pada tekanan rendah tabung beroperasi dengan suplai daya yang memberikan voltase sampai 300 v, arus melewati tabung berjangka milliampere.

Atom-atom terionkan dalam discal listrik dan ion neon atau argon yang berenergi dipercepat menuju katode yang negatif, dimana tabrakan dengan permukaan akan melepaskan atom-atom logam katode, suatu proses yang kadang-kadang disebut desisan atau sputering. Pada tabrakan lebih lanjut dalam ion dan atom yang berenergi, atom-atom logam yang terpercik akan tereksitasi kemudian dalam daerah discas yang lebih dingin akan memancarkan spektrum garis yang karakteristik dari logam katode yang tampak sebagai suatu pijaran dalam rongga katode yang cekung itu. suatu garis resonansi dipilih dari spektrum ini untuk mengukur serapan.

9. *Proses pembakar.*

Ada dua macam pembakar yang digunakan yaitu dengan sistem pengabut. Pembakar pra campur (premix-Nebuliser-burner). Aliran aksi dan melewati ujung atas suatu tabung kapiler menarik sampel dari dalam suatu wadah dan memecahkannya menjadi tetes-tetes halus mirip kerja penyemprot parfum. Bahan bakar juga diumpankan ke kamar itu dan aerosol sampel disapu melewati sederetan sekat yang mengirim tetes-tetes besar ke saluran dan memperbolehkan kabut tetes-tetes halus menyertai pemupukan golongan bahan bakar dan oksidan ke dalam pembakar.

Nilai absorbans yang diperoleh untuk konsentrasi analitik tertentu dalam larutan sampel asli bergantung pada efisien pengaburan dalam kamar pra campur dan kemudian pada temperatur (serta variasinya menurut jarak diatas puncak pembakar) dan pada laju alis gas lewat nyala, karena faktor-faktor ini menetapkan besarnya populasi atom berdasarkan berkas sumber cahaya. Dengan aliran sampel yang berkesinambungan kita mengharapkan untuk memperoleh populasi atom yang lunak dan konstan serta cukup lama untuk memungkinkan pengukuran dan kondisi hasilnya harus cukup agar sejumlah besar sampel maupun larutan standar dapat diperbandingkan.

Pengaturan pembakaran pracampur menghabiskan banyaknya sampel karena 80 atau 90 % sampel diarahkan kesaluran buangan oleh sistem pekat. Jika laju perambatan nyala menjadi lebih besar dari pada laju aliran gas kedaalm pembakar, dapat terjadi suatu ledakan berbahaya dalam kamar pra campur. Hindari penggunaan penggabungan bahan bakar oksidan tertentu seperti hidrogenoksigen (H_2O_2).

Jenis pembakar laju yang sering digunakan dalam serapan atom adalah pembakar penghembus integral dan konsumsi total yang mula-mula dikembangkan untuk pancaran nyala. Larutan sampel disedot oleh pipa kapiler tengah oleh aliran udara atau lewat ujung yang dikuncingkan dari pipa dalam nyala oleh gas-gas yang berdesakan. Konsumsi sampel jauh lebih rendah 0,5-2 ml per menit lewat 10-30 ml per menit, tidak ada ledakan atau bahaya. H_2O_2 dapat digunakan dengan aman.

Pembakar pra campur jauh lebih luas pemakaiannya. Pengaburan dalam tanur grafit yang dipanasi listrik lebih unggul dan kepekaannya jauh lazimnya beberapa mikroliter sampel ditaruh pada batang grafit atau lekukan krus grafit yang kecil. Pelarutannya diuapkan diluar tanur dengan mengalirkan arus lewat piranti pencuplikan sampel. Jika diinginkan temperatur bisa dinaikan dengan cepat 2000-3000°C yang akan menghabiskan awan yang

terjadi dari uap atom, dalam beberapa detik saja. Uap dimasukkan dalam aliran gas lamban seperti gas argon untuk mencegah oksidasi bahan tamur, dengan menggerakkan uap sampel dengan cepat lewat tanur setengah menghindari terkontaminasinya dinding garfit yang dapat ditembus oleh komponen-komponen uap.

Kemudian populasi atom itu muncul sebagai suatu denyut sekejap dalam pipa grafit yang daalm lintasan optis spektrofotometer itu.

10. Komponen-Komponen Lain.

Komponen lain dari SSA/AAS adalah konvensional sifatnya monokromator melewati garis kesonans yang dipilih tanpa dibarengi garis-garis lain dalam spektrum sumber cahaya yang timbul dari katode logam atau gas lambannya. Biasanya dapat ditemukan suatu garis sumber yang memuaskan yang cukup berjauhan dari garis-garis lain, sehingga tidak menuntut monokromator terbaik untuk memencilkan. Detektor lazimnya tabung pengganda foton (multiplier tube), karena garis yang kita tangani terletak dalam daerah UV tampak dari spektrum itu. Piranti kaca dapat berupa galvanometer, volmeter digital, atau potensiometer perekam pena tinta untuk laboratorium dengan beban yang berat keluaran penguat dapat didigit atau diproses dengan komputer.

Latihan

1. Jelaskan jenis jenis fotometer yang digunakan di laboratorium
2. Jelaskan cara pengoperasian spektrofotometer spektronic-20 yang digunakan di Laboratorium
3. Bagaimana cara pemeliharaan/perawatan alat fotometer yang digunakan di Laboratorium
4. Jelaskan prinsip kerja dari AAS

BAB 6

KROMATOGRAFI

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui jenis jenis kromatografi
2. Mengetahui tentang kromatografi lapis tipis
3. Mengetahui tentang kromatografi kertas
4. Mengetahui tentang kromatografi gas

B. Pendahuluan

Kromatografi adalah suatu metode analitik untuk pemurnian dan pemisahan senyawa-senyawa organik dan anorganik yaitu suatu nama metode pemisahan yang dilakukan dengan cara menggerakkan satu fase secara mekanis terhadap fase yang lainnya dalam keadaan kesetimbangan. Metode ini diperkenalkan pada tahun 1903 oleh TSWETT, yang telah menggunakannya untuk pemisahan senyawa-senyawa yang berwarna dan nama kromatografi diambil dari senyawa-senyawa yang berwarna. Meskipun demikian pembatasan untuk senyawa-senyawa yang berwarna tak lama dan hampir kebanyakan pemisahan-pemisahan kromatografi sekarang diperuntukkan pada senyawa-senyawa tak berwarna, termasuk gas.

Kromatografi menggunakan dua fasa yaitu satu fasa tetap (stationary) dan fasa bergerak (mobile). Pemisahan senyawa tergantung pada gerakan relatif dari kedua fasa ini. Kromatografi dapat digolongkan sesuai dengan sifat-sifat dari fasa tetap, yang berupa zat padat dan cair. Jika fasa tetap berupa zat padat maka cara tersebut dikenal dengan kromatografi serapan (absorption chromatography); jika fasa tetap berupa zat cair, dikenal sebagai (partition chromatography). Jika pemisahan terjadi masing-masing komponen keluar dari kolom pada interval waktu yang berbeda, mengingat bahwa proses ke seluruhnya adalah fenomena migrasi secara diferensial

yang dihasilkan oleh tenaga pendorong tidak selektif berupa aliran fase bergerak.

1.2 Klasifikasi kromatografi

Karena fasa bergerak dapat berupa zat cair atau gas maka kromatografi dapat diklasifikasikan menjadi empat macam sistem kromatografi. Keempat macam sistem kromatografi tersebut adalah :

1. Fasa bergerak zat cair-fasa tetap padat: Dikenal sebagai kromatografi serapan yang meliputi
 - Kromatografi lapis tipis.
 - Kromatografi penukar Ion.
2. Fasa bergerak gas –fasa tetap padat:
 - ✚ Kromatografi gas padat.
3. Fasa bergerak zat cair-fasa tetap zat cair: Dikenal dengan kromatografi Partisi
 - ✚ Kromatografi Kertas.
4. Fasa bergerak gas- fasa tetap zat cair:
 - ✚ Kromatografi gas-cair
 - ✚ Kromatografi Kolom Kapiler

Pemisahan dengan kromatografi tergantung pada distribusi sendiri dari senyawa-senyawa yang akan dipisahkan diantara fasa tetap dan fasa bergerak dalam perbandingan yang berbeda-beda antara satu senyawa dengan senyawa yang lain. Pada Kromatografi fase gerak dapat berupa gas atau cairan, sedangkan fase diam dapat berupa zat cair atau padat.

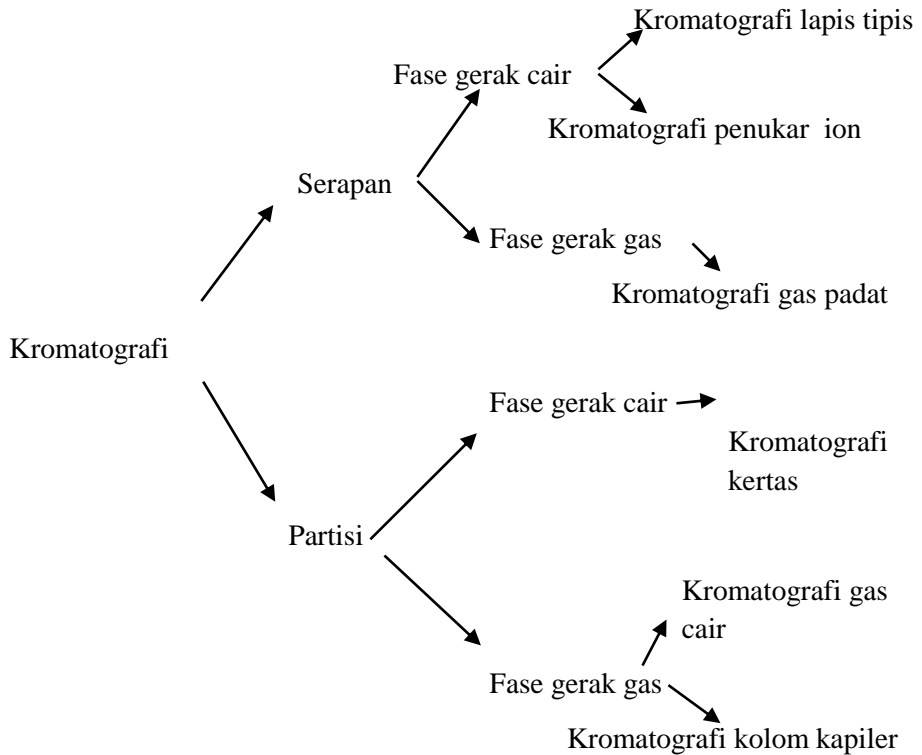
1.3 Terminologi Kromatografi

Kromatografi dapat dilukiskan dengan berbagai istilah. Istilah yang paling sering dijumpai adalah nilai R_f , juga dikenal sebagai factor retardasi atau dinyatakan sebagai volume retensi (V_R) atau waktu retensi (I_R). Semua ini adalah suatu besaran yang menyatakan berapa lama fraksi waktu molekul zat terlarut tinggal dalam fase bergerak. Masing-masing senyawa mempunyai nilai R atau VR yang berbeda dengan berubahnya

kombinasi pelarut penyerap. Suatu koefisien partisi (K_d) menyatakan konsentrasi zat terlarut dalam tiap fase.

1.4 Jenis-jenis kromatografi

Berdasarkan sifat-sifat fasa tetap yang digunakan maka kromatografi dapat digolongkan sebagai berikut :



1.5 Kromatografi kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu cara kromatografi yang sering digunakan. Peralatan yang digunakan untuk cara ini cukup sederhana. Terjadinya pemisahan dapat secara adsorpsi, partisi atau keduanya.

Macam macam kromatografi kolom

- ❖ Kromatografi kolom adsorpsi
- ❖ Kromatografi kolom partisi

Prinsip Dasar Kromatografi Adsorpsi

Kromatografi adsorpsi didasarkan pada retensi zat terlarut oleh adsorpsi permukaan. Teknik ini berguna dalam pemisahan senyawa senyawa nonpolare dan konstituen-konstituen yang sulit menguap. Pada kromatografi cair padat; suatu substrat padat bertindak sebagai fase diam. Pemisahan tergantung pada kesetimbangan yang terbentuk pada bidang antar muka diantara butiran-butiran fase diam dan fase cair bergerak serta pada kelarutan relative zat terlarut pada fase Bergeraknya.

Kromatografi kolom adalah kromatografi yang menggunakan kolom dari gelas yang dilengkapi dengan kran yang digunakan untuk analisa kualitatif, kuantitatif atau preparative. Pemisahan berdasarkan absorpsi komponen-komponen campuran dengan afinitas yang berbeda-beda pada permukaan fase diam (absorpsi). Fase bergerak mengalir membawa komponen-komponen campuran dengan kecepatan berbeda-beda sesuai dengan afinitas komponen tersebut terhadap adsorpsi. Komponen dengan afinitas paling kecil akan bergerak lebih cepat.

Adsorben hendaknya memenuhi syarat berikut:

- a. Tidak larut dalam fase bergerak
- b. Iner (tidak bereaksi dengan zat uji/sampel).
- c. Cukup aktif sehingga memungkinkan penambatan zat uji.
- d. Memungkinkan aliran yang baik dari fase bergerak.

Dalam pemilihan adsorben dan fase bergerak sebagai pegangan digunakan adsorben yang polaritasnya sama dengan zat uji sedangkan sebagai fase bergerak digunakan yang polaritasnya berlawanan.

Kromatografi adsorpsi sering digunakan dalam pemisahan senyawa-senyawa organik. Dibandingkan teknik penukar ion, teknik ini jarang sekali digunakan untuk pemisahan logam-logam ataupun senyawa-senyawa

anorganik. Berbagai faktor harus benar-benar terkendali seperti pemilihan pelarut yang tepat, konsentrasi adsorbenda, temperature, misalkan dalam pemisahan turunan-turunan alcohol, aldehid dan sebagainya.

1.6 Kromatografi Kertas.

Kromatografi kertas adalah cara pemisahan suatu komponen zat didalam campuran dengan dengan jalan penyarian menggunakan fase gerak zat cair dan fase diam yang berupa air/ zat cair lainnya yang berada dalam serat-serat sellulos pada kertas.

Kromatografi kertas adalah merupakan kromatografi yang menggunakan kertas. Kertasnya adalah selulosa murni mempunyai afinitas yang besar terhadap air atau pelarut polar lainnya, sehingga air atau pelarut polar tersebut dapat merupakan lapisan tipis pada kertas. Larutan zat uji yang akan dipisahkan komponennya ditotolkan diatas kertas dan cairan fase bergerak akan melewatinya dan dengan demikian akan terjadi pemisahan dan diperoleh bercak komponen.

Mekanisme pemisahan komponen berdasarkan partisi. Kromatografi kertas sering digunakan pada identifikasi obat, racun atau senyawa dalam cairan tubuh juga pada analisa semi kuantitatif.

Teknik Kromatografi Kertas

Proses pengeluaran asam mineral dari kertas disebut desalting. Larutan ditempatkan pada kertas dengan menggunakan mikropipet pada jarak 2-3 cm dari salah satu ujung kertas dalam bentuk coretan garis horizontal. Setelah kertas dikeringkan maka diletakkan didalam ruang yang sudah dijenuhkan dengan air atau pelarut yang sesuai. Penjenuhan dapat dilakukan 24 jam sebelum analisis.

Ada tiga teknik pelaksanaan analisis yaitu; *Descending*, adalah salah satu teknik dimana cairan dibiarkan bergerak menuruni kertas akibat gravitasi. Pada teknik *ascending*; pelarut bergerak keatas dengan gaya kapiler. Nilai Rf harus sama baik pada *descending* maupun *ascending*, Sedangkan yang ketiga dikenal sebagai cara radial atau kromatografi kertas sirkuler

Prinsip

Zat warna dari makanan/ minuman diekstraksi dengan asam, sampai zat warna akan terikat pada benang wool bebas lemak dan dipekatkan kemudian dianalisis dengan kromatografi kertas.

Alat yang digunakan : Beaker glass, Batang pengaduk, pemanas listrik, banang wool bebas lemak, kertas saring whatman no 1, bejana kromatografi, penotol.

Bahan bahan : Amonia 10 %, Asam asetat 6% Eluen (Chloroform : Metanol : Air) 15 : 6 : 1 dan pembanding warna.

Prosedur Kerja

- ✚ Sampel diambil ± 50 ml ditambah asam asetat hingga bereaksi asam,
- ✚ Kemudian benang wool dimasukkan dan dipanaskan hingga selama 10 menit.
- ✚ Benang wool diangkat lalu dimasukkan kedalam cawan/beaker glass
- ✚ Tambahkan ammonia 10% sebanyak 25 ml kemudian dipekatkan dengan hati-hati dengan pemanasan.
- ✚ Dengan Mikropipet atau penotol, sampel diambil lalu ditotolkan pada kertas whatman no 1 (Pembanding dikerjakan seperti sampel).
- ✚ Masukkan dalam bejana kromatografi yang telah diisi dengan eluen.
- ✚ Biarkan larutan naik hingga keatas atau batas tertentu.
- ✚ Bandingkan bercak zat warna pembanding dengan sampel
- ✚ Hitung nilai Rfnya.

1.7 Kromatografi gas

Kromatografi gas adalah kromatografi yang menggunakan gas sebagai fase bergerak. Fase diam berupa zat padat atau zat cair diletakkan

dalam kolom yang panjang dan besarnya tertentu. Kromatografi ini dapat digunakan untuk analisa kualitatif maupun kuantitatif.

Bagian kromatografi gas :

- | | |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| 1. Gas pembawa / fase gerak | 6 Pengatur aliran dan pengendali gas |
| 2. Gerbang suntik | 7. Kolom |
| 3. Detektor | 8. Pengendalian suhu |
| 4. Ampiflier | 9. Rekorder kromatogram |
| 5. Analisa kualitatif | 10. Analisa kuantitatif |

Jenis kromatografi gas ada dua macam yaitu:

- a. Kromatografi padatan gas (GSC)
- b. Kromatografi cairan gas (GLC)

Teknik pemisahan kromatografi terjadi dengan cara sample diubah menjadi bentuk uap dan dibawah oleh fase gerak (gas) yang iner dan mengalir secara terus menerus melewati suatu kolom yang bersifat memilih untuk dibawah dan dipisahkan, hasil pemisahan keluar dari kolom untuk dievaluasikan dan dideteksi secara elektrik mekanik dan selanjutnya direkam pada alat perekam(recorder).

1.8 Kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis adalah kromatografi menggunakan lapis tipis yaitu lapisan absorben yang melekat pada platiner misalnya kaca aluminium atau pelekats polister. KLT digunakan untuk menganalisa kualitatif dan analisa kuantitatif.

Mekanisme pemisahan komponen berdasarkan absorpsi atau partisi Kromatografi lapis tipis memiliki beberapa keunggulan yaitu:

- a. Pemisahan berjalan lebih cepat.
- b. Sensitif artinya walaupun konsentrasi zat uji kecil masih dapat dideteksi
- c. Resolusinya tinggi hingga pemisahan sempurna dan terlokalisir dengan baik.

Kromatografi Lapisan Tipis (KLT) digunakan untuk pemisahan senyawa secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempengan kaca. Lempeng yang dilapisi dapat dianggap sebagai “kolom kromatografi terbuka” dan pemisahan dapat didasarkan pada adsorpsi (penyerapan), partisi (pembagian) atau gabungannya, tergantung dari jenis zat penyerap dan jenis pelarut. Pada kromatografi lapisan tipis fase gerak berupa cairan dan fase diamnya adalah lapisan tipis pada permukaan lempeng yang rata.

Prinsip KLT adalah: Zat pada campuran terpisah oleh proses migrasi dalam sistem masing-masing substansi menjalankan kecepatan yang disebabkan oleh perbedaan partisi, kelenturan tekanan, uap dan ukuran molekul.

Fase geraknya merupakan media transport untuk zat yang dipisahkan secara migrasi melalui fase tetap, dengan daya kapiler. Tiap molekul memilih antara kondisi diserap atau berjalan melalui fase diam. Kromatografi lapis tipis lebih menguntungkan daripada kromatografi kertas sebagai media reaksi warna, karena banyak pereaksi penunjuk bercak bersifat korosif dan tidak dapat digunakan pada kertas.

1. Komponen – komponen KLT

a) Bahan penyangga/Lempeng penyangga.

Bahan penyangga hendaknya digunakan bahan yang stabil terhadap pereaksi korosif yang banyak digunakan adalah kaca, kecuali itu dari lempeng aluminium dan plastik dengan tebal dan rata seluruh permukaan. Ukuran bahan penyangga, panjang 20 cm dan lebar 5,10 cm atau 20 cm yang sering digunakan untuk pengujian dengan ukuran 20x20 cm. Lempeng siap pakai ada yang berbentuk gulungan (aluminium atau plastik).

b). Baki lempeng.

Umumnya baki lempeng berukuran 122x23 cm dengan satu sisi panjang dan satu sisi pendek yang berbingkai untuk menakar lempeng kaca pada waktu membuat lapisan zat penyerap hingga diperoleh permukaan yang rata.

c). Rak penyimpan/Rak pengering.

Rak penyimpan digunakan untuk menempatkan lempengan yang telah dilapisi zat penyerap selama pengeringan atau untuk membawa lempeng. Rak mempunyai ukuran yang cocok sehingga dapat masuk kedalam lemari pengering. Dapat memuat lebih kurang 10 lempeng dengan jarak tertentu.

d). Zat penyerap.

Zat penyerap dapat terdiri dari zat penyerap kromatografi yang halus. Fosfor dapat ditambahkan untuk melihat resapan ultra violet senyawa yang meresap ultra violet. Zat penyerap dapat dilapiskan langsung pada lempeng kaca atau dengan pertolongan zat perekat, misalnya kalsium-sulfat anhidrat 5 % sampai 15 % atau kanji. Kalsium tidak dapat memberikan permukaan yang keras seperti kanji, tetapi tidak terpengaruh bereaksi semprot yang bersifat oksidator kuat.

e). Alat pembuat lapisan.

Alat pembuat lapisan berbentuk bak panjang yang dibuat dengan teliti, mempunyai celah memanjang pada dasarnya. Jika digerakkan diatas lempeng kaca, akan memberikan lapisan zat penyerap serbuk rata pada seluruh

Gambar 1. Alat Pembuat lapisan



permukaan lempeng setebal 0,25 mm. Untuk memperoleh tebal lapisan yang, digunakan alat pembuat lapisan yang lain, digunakan alat pembuat lapisan yang dapat diatur.

f). Bejana kromatografi.

Bejana kromatografi umumnya dapat memuat dua lempeng kaca dan dapat ditutup rapat. Dalam bejana dapat dimasukkan sebuah rak penyangga terbuat dari baja tahan karat yang dapat memuat lempeng kaca adalah menyebelah. Bagian atas bejana asa halus dan rata serta dapat dengan tutup kaca dengan pertolongan lemak penutup.

g). Sablon

Sablon umumnya dibuat dari plastik digunakan untuk membantu memberi tanda pada tempat penotolan dengan jarak tertentu dan untuk membantu memberi tanda lain pada lempeng.

h). Pipet mikro.

Pipet mikro berskala 10 ul untuk memindahkan cairan jumlah larutan zat yang diperiksa dan larutan baku yang harus ditotolkan, tertera pada masing-masing monokrafi. Ukuan pipet mikro bermacam-macam yaitu 1 ul 2 ul 5 ul 10 ul dan 20 ul.

i). Alat penyemprot pereaksi.

Alat penyemprot tahan terhadap pereaksi dan dapat menyemprot pereaksi dalam bentuk butir-butir halus.

j).Lampu Ultra Violet.

Lampu ultra violet yang cocok untuk pengamatan dengan panjang gelombang panjang (366 nm)

2. *Adsorben/ Fase diam*

Sebagai fase diam digunakan adsorben dengan partikel yang halus yang dipoliskan pada lempeng penyangga kaca, logam atau plastik.

Adsoben yang sering digunakan antara lain :

a). *Silika gel*.

Yang paling banyak digunakan dalam pengujian, bersifat asam lemah, sering ditambah CaSO_4 (gibs) sebagai pengikat agar melekat kuat kepada penyangga penambahan ini juga mempercepat mengeringnya lapis tipis. Juga dapat ditambahkan indikator flouresensi yang akan berflouresensi sinar UV pada 254 nm, hingga noda yang mengabsorpsi pada frekuensi ini menjadi sangat kontras terhadap latar belakang yang berflouesensi hijau kuning. Silika gel sangat higroskopis, pada humiditas relatif 45 – 75 % akan menarik air sampai 7-20%. Derajat diaktifasinya ditentukan oleh kelembaban ruangan dimana pemisahan akan dilakukakn pada tempat

penyimpanan lapis tipisnya. Kemurnian juga penting karena dapat mempengaruhi watak kromatografi beberapa sinyal tertentu. Pencemar dalam adsorben ini dapat juga menyebabkan dekomposisi senyawa yang hendak dianalisa

b) Alumina

Bersifat basa lemah tidak sebaik silika gel dan lebih relatif secara kimia hingga untuk senyawa yang sensitif dapat terdegrasi. Juga dapat ditambah Ca_2SO_4 dan indikator Flourisensi

c) Kleselguhr

Merupakan adsorben netral dengan aktifitas rendah. Daya reselusnya kecil dapat ditambahkan sebagai campuran pada silika gel yang akan membeikan adsorben campur yang kurang aktif. Juga dapat ditambah Ca_2SO_4

d) Selulosa

Dengan menggunakan selulosa sebagai adsorben akan didapat lapis tipis yang sifatnya analog dengan kromatografi kertas . memberikan lapis tipis yang baik tanpa pengikat . Adsorben ini dapat ditambah indikator flourisensi atau Ca.Asetat. Kerugian penggunaan selulosa ini tidak dapat digunakan untuk pereaksi yang korosif seperti Asam sulpat atau pereaksi destroktif lainnya .

e) Poliamida

Merupakan magnesium silikat. Daya melekatnya tidak sebaik adsorben lainnya. Biasanya ditambahkan pengikat seperti selulosa atau amilum. Mempunyai kapasitas yang besar dan banyak digunakan untuk pemisahan fenol.

3. ***Cara pembuatan lapisan tipis /lembing.***

Kondisi penting lainnya untuk mendapatkan pemisahan yang baik dan hasil yang reproduibel adalah pembuatan lapisan tipisnya. Sebagai penyangga hendaknya digunakan bahan yang stabil terhadap pereaksi korosif yang banyak digunakan adalah kaca.

Kerugiannya adalah mudah pecah. Dapat juga dari plastik, tetapi kurang stabil terhadap pereaksi yang korosif. Pembuatan lapis tipis pada penyangga ini dapat dilakukan dengan cara:

a) Cara semprot

Dengan menyemprot suspensi pada penyangga sehingga terbentuk lapisan.

b) Cara mencelup

Dengan yang dibuat dimasukkan dalam suatu bejana. Dua penyangga ditangkupkan dan dicelupkan dalam bejana tersebut, sehingga hanya satu permukaan yang akan dilapisi penyerap/adsorben.

c) Cara Penuangan

Suspensi yang telah disiapkan dituangkan pada bahan penyangga, kemudian diratakan dengan jalan menggoyang perlahan-lahan sehingga seluruh suspensi melapisi bahan penyangga. Cara ini sukar mendapatkan lapisan zat penyerap dengan ketebalan yang sama.

Lapisan tipis yang didapat dengan cara-cara tersebut diatas didiamkan diudara sampai kering yang biasanya memakan waktu 10 – 20 menit, kemudian dipanaskan dalam temperatur (oven) 100-110 C selama 30 menit, aktifasi dilakukan dengan pemanasan untuk menghilangkan air yang ada. Adanya air akan memblok secara efektif lapisan permukaan hingga permukaan menjadi kurang aktif. Untuk aktifasi ini lapisan tipis silika gel dan kiesel guhr dipanaskan pada 105 -110 C selama 30 – 60 menit selulosa pada 105 C selama 10 menit sedangkan alumina dipanaskan pada suhu yang lebih tinggi

4. Fase Gerak

Cairan pengembang yang dipakai untuk kromatografi lapis tipis harus cukup murni atau campuran dari pelarut murni, karena cairan pengembang tadi akan melarutkan kembali zat-zat yang terserap pada bahan penyerap sesudah ditotolkan diatas lempeng . Dengan adanya bahan lain yang mengganggu atau mengurangi kemurnian cairan seluen, seperti air ataupun alkohol maka kelarutan kembali zat-zat yang telah terserap akan

berkurang ataupun teganggu sehingga tidk didapatkan pemisahan yang sempurna. Cairan pengembang hendaknya dipilih sedemikian rupa sehingga bercak yang diperoleh terletak pada daerah (Haya RF) 20-80% dari jarak yang ditempuh fase gerak pada lempengan tipis. Dalam pemilihan fase gerak perlu memperhatikan:

- ✚ kelarutan senyawa dalam fase gerak
- ✚ polaritas dari fase gerak
- ✚ kemurnian komponen pelarut penyusun fase gerak
- ✚ pengaruh fisika kimia senyawa dan fase gerak seperti terjadi interaksi antara senyawa dan cairan pengembang.

5. *Penotolan*

Penotolan dapat dilakukan dengan pipet mikro atau pipet lambda atau jarum mikro dibantu dengan sablon dengan jarak kira-kira 2 cm dari tepi bawah lempeng. Jarak penotolan 1.5 cm dai titik penotolan jumlah contoh yang ditotolkan untuk pemisahan atau dengan tujuan analisa kualitatif adalah 1 - 20 ul dari larutan dengan konsentrasi 0,5 -1%. Deameter penotolan hendaknya sekecil mungkin, biasanya lebih kecil daripada penotolan pada Kromatografi lapis kertas. Penotolan dapat berupa titik/bulatan ataupun dalam bentuk garis, kecuali dengan penotol biasa (mikropipet) dapat digunakan dengan alat yang lebih modern autoliner multisporter.

6. *pengembangan*

teknik pengembangan analog kromatografi kertas, pelarut pengembang diisikan kedalam bejana kurang 1 jam sebelum digunakan, dinding bejana sebaiknya dilapisi dengan kertas saring tebal untuk menjaga kejenuhan. Zat uji dan zat pembanding yang telah ditotolkan pada lempeng tipis dimasukkan kedalam bejana yang telah jenuh sempurna. Tempat penotolan tidak boleh terendam, kemudian bejana harus ditutup rapat. Fase gerak merambat samoai jarak rambat tertentu yaitu sesuai dengan monografi yang tertera. Lempeng dikeluarkan, dikeringkan diudara, kemudian dideteksi dengan sinar ultra violet gelombang pendek / gelombang panjang. Bila perlu disemprot dengan larutan penunjuk bercak.

Proses pengembangan dapat dibedakan menjadi:

a. pengembangan normal
pengembangan dilakukan satu kali dengan jarak rambat 10 cm atau 15 cm

b. Pengembangan Ganda

Setelah dilakukan pengembangan normal (satu kali), lempeng diangkat dari bejana pengembangan dan dikeringkan pada suhu kamar. Setelah kering lempeng dikembangkan lagi dalam bejana yang sama dengan jarak rambat yang sama pula.

c. Pengembangan bertingkat

Mula-mula lempeng dikembangkan dengan cairan pengembang (sistem fase gerak) pertama, sampai jarak rambat tertentu, kemudian lempeng diangkat. Dikeringkan sampai suhu kamar. Setelah benar-benar kering, lempeng dikembangkan lagi dengan cairan pengembang kedua sampai jarak waktu tertentu.

d. Pengembangan dua dimensi

Mula-mula lempeng dikembangkan dengan cairan pengembang (sistem fase gerak) pertama sampai jarak tertentu. Kemudian lempeng diangkat dan dikeringkan. Setelah itu lempeng dikembangkan lagi dengan arah yang berbeda.

7. Deteksi

a) Metode deteksi secara fisika

Untuk ini dapat digunakan sinar UV gelombang pendek 254 nm atau gelombang panjang 366 nm, sebaiknya digunakan lempeng yang mengandung indikator fluoresen, sehingga bercak yang mengadsorpsi sinar ultra violet akan terlihat dengan jelas karena kontras dengan latar belakang yang berpendar kuning kehijauan.

b) Metode deteksi secara kimia

Deteksi secara kimia tergantung dari reaksi senyawa lapis tipis yang akan memberikan warna tertentu atau fluoresensi. Reaksi dilakukan dengan menyemprot atau melewati kromatogram melalui lautan pereaksi. Jika kromatogram dilewatkan kedalam larutan pereaksi maka pelarut yang pereaksi yang digunakan.

c). Metode deteksi secara enzimatik dan biologik

d). Pengukuran Radioaktifitas

8. Evaluasi

hasil Kromatografi Lapis Tipis dapat dievaluasi antara lain dengan melihat harga RF, hRF, RRF:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh bercak uji}}{\text{Jarak rambat fase gerak}}$$

$$hR_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh bercak uji} \times 100}{\text{Jarak rambat fase gerak}}$$

$$RR_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh bercak Uji}}{\text{Jarak yang ditempuh bercak zat tertentu}}$$

9. Hal-hal yang perlu diperhatikan pada Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis seperti metode kromatograf lainnya adalah metode analisis perbandingan. Untuk identifikasi senyawa haruslah digunakan perbandingan dan tidak dapat digunakan R_f yang ada dalam pustaka.

Jika suatu sampel yang tidak diketahui memberikan satu bercak setelah pengembangan dengan sistem pelarut tertentu, belum berarti bahwa sampel hanya mengandung hanya satu senyawa tersebut. Untuk memastikan harus dilakukan pengembangan dengan sistem pelarut yang lainnya atau digunakan metode pengembangan lainnya.

Jika suatu senyawa yang tidak diketahui menunjukkan R_f yang sama dengan senyawa perbandingan, belum berarti bahwa kedua zat adalah sama. Untuk memastikan maka harus dikembangkan dengan pengembang yang lain.

Latihan

1. Jelaskan perbedaan dari kromatografi lapis tipis dengan kromatografi gas
2. Jelaskan komponen dari kromatografi lapis tipis
3. Apakah yang dimaksud dengan kromatografi kolom

BAB 7 POTENSIOMETER

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui penggunaan alat potensiometri
2. Mengetahui pemeliharaan alat potensiometr

B. Pendahuluan

Cara Potensiometer untuk pengukuran pH dengan menggunakan elektroda kaca saring lebih mudah daripada menggunakan elektoda hydrogen, terutama untuk larutan yang mengandung zat pengoksidasi, ketelitian dalam batas ± 0.005 dan penetapan ulang dengan ketelitian yang sama umumnya dapat dicapai dengan elektroda hydrogen, yang dengan elektroda kaca jarang tercapai dan pada $\text{pH} < 2$ dan $\text{pH} > 10$ tidak tercapai.

Jika menggunakan elektroda kaca ketelitian terbaik diperoleh dengan anggapan bahwa dalam suatu jarak pH yang pendek ,harga pH berbanding lurus dengan gaya gerak listrik yang diukur. Yang harus diperhatikan adalah elektroda tersebut harus ditera dengan 2 macam larutan baku (buffer) yang memiliki nilai pH yang terdekat dan sebaiknya nilai pH yang ditentukan itu terletak diantara pH kedua larutan baku tersebut. (Farmakope,III,1979)

1. PRINSIP KERJA

Pengukuran pH didasarkan pada prinsip bahwa sebuah potensial listrik akan ditempatkan pada permukaan sebuah logam yang disimpan pada larutan garam pengencer yang disebut sebagai *larutan elektrolit*. Ini memungkinkan untuk menggambarkan pola elektroda untuk pengukuran spesifik dari ion tipe tunggal dalam campuran ion-ion lain dalam larutan, ion hydrogennya berupa elektroda yang terbuat dari kaca , Jenis elektroda kaca ini dibuat khusus dari kaca yang memiliki kemampuan dimana ion hydrogennya bisa diserap dan menembus hingga bagian yang paling dalam. Elektroda kaca dalam pengukuran pH 1 – 11 selalu dalam gabungan “ *Referensi Elektroda* ” yakni elektroda yang dapat memelihara potensial tetap bahkan ketika konsentrasi ion dapat berubah-ubah dalam pengujian larutan, sedangkan yang paling sering digunakan adalah kalomel elektroda

(Hg/HgCl₂ elektroda) potensial dari kalomel elektroda ini selalu tetap diatas pH 1. Sebelum memeriksa pH sample, elektroda kalomel harus dibandingkan dengan kalomel lain dimana kedua elektroda tersebut harus direndam dalam buffer yang sama (KCl) yang harus mempunyai perbedaan potensial elektroda < 5 mV.

Jadi prinsip Potensiometer yaitu : elektroda kaca yang hanya dimasuki ion H dikonvensi pada rumus :

$$\text{pH} = \frac{E \times 0.222 \text{ Volt}}{0.591}$$

ket :

E : Potensial elektroda sample yang diukur.

2. **KALIBRASI**

Dalam mendapatkan pengukuran yang tepat, Potensiometer harus dikalibrasi dengan dua macam buffer standar dari pH 4 dan pH 7 setiap hari. Untuk kalibrasi pHmeter disini menggunakan buffer khusus yang harus dibandingkan dengan larutan yang akan diperiksa pHnya ,Buffer yang dipakai disini adalah buffer phospat dan buffer acetate. Beberapa larutan buffer yang juga sering digunakan adalah Kalium tetraoxalat, Kalium biftalat, Ekuimolal phospat, Natrium tetraborat.

Urutan kalibrasinya sebagai berikut :

- a. Nyalakan Alat dan biarkan pada suhu kamar selama 20 – 30 menit.
- b. Putar tombol “zero” sampai meteran menunjukkan angka yang ditentukan dalam instruksi manual, kemudian atur temperaturnya dengan memutar “ temperature selector “.
- c. Cuci elektroda dengan cairan khusus pencuci elektroda.
- d. Standarisasi elektroda harus dilakukan diawal kerja dengan memakai larutan buffer standar yaitu yang berpH 4 dan pH 7.
- e. Pindahkan elektroda ke beaker glass yang berisi standar buffer pH 4

- f. Ukur pH dengan mengatur knob buffer control untuk membaca hasil.
- g. Pindahkan elektroda ke wadah lain (beaker gelas) untuk buffer standar pH 7 dengan perlakuan yang sama.
- h. Baca Hasil pH pada buffer standard dan hasil yang keluar harus mendekati pH diantara kedua buffer standar tersebut.

3. PEMBACAAN SAMPEL

- a. Cuci elektroda dengan cairan khusus pencuci elektroda dan pindahkan kedalam larutan uji, potensial elektroda tetap akan bereaksi dalam 5 – 20 detik, setelah elektroda tersebut dimasukkan kedalam larutan sample.
- b. Cek temperature setiap pengukuran kemudian ukur dan atur temperature untuk pembacaan hasil.
- c. baca pH pada posisi stabil, kemudian cuci elektroda dan simpan kembali kedalam wadah yang telah berisi larutan pelindung.
- d. Hindari adanya gelembung udara pada elektroda yang akan menyebabkan penyimpangan potensial elektroda.

4. PERAWATAN ALAT

Hal-hal yang perlu diperhatikan antara lain :

- Setelah pengukuran selesai selector harus diputar pada posisi “ zero “
- Setiap pemakaian elektroda harus segera dicuci dan dikalibrasi kemudian disimpan kedalam wadahnya.
- Elektroda kaca harus disimpan dalam HCl encer sedangkan untuk elektroda kalomel harus dibiarkan tercelup dalam KCl.

5. LAIN – LAIN

Masalah yang dapat timbul dengan buffer yang bersifat basa adalah adanya penurunan nilai pH karena penyerapan CO₂ dari

udara. Buffer tersebut juga dapat dipengaruhi oleh sinar UV, perubahan temperature dan kontaminasi bakteri. Untuk menghindari pertumbuhannya dapat dicegah dengan penambahan antiseptic yang dapat memelihara buffer agar dapat tahan lama dengan kualitas yang tetap terjaga.

Jika diinginkan ketelitian yang lebih besar, suhu larutan baku, elektroda, elektroda kalomel, larutan yang diperiksa harus terletak antara dua suhu yang berbeda tidak lebih dari 2 °C. Elektroda, larutan baku, larutan uji dan air pencuci harus disimpan pada suhu pengukuran selama tidak kurang dari 2 jam sebelum pengukuran.

Elektroda kaca dinyatakan rusak jika setelah alat ditera dengan larutan baku primer tidak memberikan nilai yang cukup tepat (± 0.02 satuan) untuk larutan baku sekunder, sebagai larutan baku sekunder umumnya dipakai Kalium tetraoxalat 0.1 M dan Natrium borat 0.1 M karena memberikan nilai pH yang terbesar.

pH pada larutan zat uji sangat berpengaruh pada nilai akhir suatu tes yang dilakukan pada zat tersebut, oleh karena itu nilai pH harus diukur setepat mungkin. Salah satu alat pengukur pH seperti yang telah dijelaskan pada bab sebelumnya yakni Potensiometer, merupakan salah satu pengukuran pH yang dapat memberikan ketelitian dan ketepatan yang tinggi jika dibandingkan dengan cara lain seperti menggunakan indikator warna.

Untuk mendapatkan hasil pengukuran pH yang tepat, harus memperhatikan hal-hal berikut :

1. Kalibrasi alat yang tepat
2. Prosedur kerja yang tepat
3. Faktor-faktor pengganggu, misalnya : penyerapan CO₂ dari udara, sinar UV, temperature, dan kontaminasi bakteri.

BAB 8 TURBIDIMETER

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui penggunaan alat turbidimeter.
2. Mengetahui pemeliharaan alat turbidimeter.
3. Mengetahui prinsip kerja turbidimeter
4. Mengetahui cara mengkalibrasi alat turbidimeter

B. Pendahuluan

Turbidimeter merupakan suatu alat yang digunakan untuk mengukur tingkat kekeruhan air. Dimana tingkat kekeruhan air diukur berdasarkan penyebaran sinar yang datang yang kemudian dipantulkan terhadap partikel senyawa. (*dikutip; Petunjuk Pengambilan Contoh Air Dan Pemeriksaan Fisika Dan Kimia Di lapangan, DepKes RI*)

Turbidimeter merupakan suatu alat yang termasuk dalam bagian metode Turbidimetri (Nefelometrik). Turbidimeter erat kaitannya dengan tingkat kekeruhan air dimana kekeruhan tersebut dapat ditimbulkan oleh bahan-bahan yang tersuspensi misalnya tanah liat, lumpur, dan bahan-bahan organik dan anorganik yang halus, plakton, dan mikroba.

Turbiditas merupakan sifat optik dimana sinar yang datang akan dipantulkan akibat adanya dispersi cahaya yang dianggap sebagai suatu perbandingan. Jadi, analisa cara Turbidimeter tidak berdasarkan adsorpsi cahaya atau asorben sampel melainkan berdasarkan penyebaran sinar atau transmittan oleh partikel-partikel senyawa yang ingin dianalisa dalam larutan. Akibat yang ditimbulkan oleh penyebaran sinar maka suatu medium akan tampak keruh dan intensitas cahaya pada arah perambatan akan mengalami pengurangan karena penyebaran foton-foton sinar oleh partikel bukan disebabkan oleh penyerapan. (*dikutip; Petunjuk Pengambilan Contoh Air Dan Pemeriksaan Fisika Dan Kimia Di lapangan, DepKes RI*).

Ada beberapa faktor yang memengaruhi penyebaran cahaya antara lain :

1. Warna partikel
2. Konsentrasi partikel

Jika suatu suspensi mengandung partikel yang sedikit maka hamburan cahaya yang dihasilkan sedikit sehingga konsentrasi semakin encer begitu pula sebaliknya.

3. Ukuran dan bentuk partikel

Ukuran dan bentuk partikel sangat mempengaruhi intensitas cahaya maka harus diseimbangkan atau disamakan antara konsentrasi larutan standar dan konsentrasi cuplikan.

4. Sudut pendeteksian
5. Tingkat berkas
6. Sensifitas alat

Tujuan dan Kegunaannya

Turbidimeter adalah alat yang digunakan untuk mengukur tingkat kekeruhan dalam sampel yang berwujud cairan. Tingkat kekeruhan air diukur dalam satuan NTU. Kekeruhan merupakan salah satu pemeriksaan air secara fisik. Kekeruhan sebaiknya diukur pada hari yang sama dengan pengambilan sampel dan bila pemeriksaan ditunda sampel harus disimpan ditempat gelap dan periksa sebelum 24 jam. (*dikutip; Petunjuk Pengambilan Contoh Air Dan Pemeriksaan Fisika Dan Kimia Di lapangan, DepKes RI*)

Defenisi

Turbidimeter merupakan suatu alat yang digunakan untuk mengukur tingkat kekeruhan air. Dimana tingkat kekeruhan air diukur berdasarkan penyebaran sinar yang datang yang kemudian dipantulkan terhadap partikel senyawa. (*dikutip; Petunjuk Pengambilan Contoh Air Dan Pemeriksaan Fisika Dan Kimia Di lapangan, DepKes RI*)

Prinsip Kerja

Prinsip kerja dari alat Turbidimeter yaitu membandingkan intensitas cahaya yang dihamburkan oleh sampel dengan intensitas cahaya yang dihamburkan oleh suspensi baku pembanding. Pada kondisi sama makin

tinggi intensitas cahaya yang dihamburkan maka makin tinggi kekeruhannya. (*dikutip; Petunjuk Pengambilan Contoh Air dan Pemeriksaan Fisika Dan Kimia Di lapangan, DepKes RI*)

Operasional Alat

Ada beberapa jenis Turbidimeter, antara lain :

- a. Micro 100 Turbidimeter
- b. Turbidimeter

Contoh pengoperasian alat pada sigrist an-line Turbidimeter.

Perawatan / Pemeliharaan Alat

Adapun cara perawatan/pemeliharaan alat Turbidimeter adalah :

- Disimpan pada tempat kering dengan suhu ruangan rendah atau dengan menggunakan AC.
- Dibersihkan setelah digunakan
- Dikalibrasi setiap waktu untuk ketepatan hasilnya. (*dikutip; Google.Com*)

Bahan-bahan pengganggu antara lain :

- Adanya gelembung udara
- Getaran dan pemakaian alat gelas kotor memeberikan hasil salah.
- Adanya warna air yang ditimbulkan oleh zat-zat terlarut yang menyerap cahaya memeberikan hasil pengukuran lebih rendah. (*dikutip; Petunjuk Pengambilan Contoh Air Dan Pemeriksaan Fisika Dan Kimia Di lapangan*).

Kalibrasi Alat

Untuk semua Turbidimeter menggunakan Formazin sebagai standart kalibrasi. Formazin terdiri dari hexamethylenetetramina dan sulfat. Formazin ini diproduksi dalam 4000 FTU (Formazin Nephelometric Unit).

Keuntungan dalam menggunakan Formazin :

- Alat bertahan lama
- Alat tidak dimakan karat oleh waktu

Ada dua spesifik standart untuk pengukuran kekeruhan yang biasa digunakan di seluruh dunia yaitu ISO 7027 dan USEPA 180.1. spesifikasi ISO 7027 menggunakan sumber cahaya tunggal. (*dikutip; Yahoo.Com*)

BAB 9

POLARIMETER

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui cara penggunaan alat polarimeter
2. Mengetahui prinsip penggunaan alat polarimeter.

B. Pendahuluan

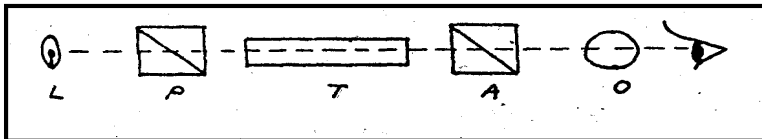
Polarimeter merupakan alat optik yang spesifik, dipergunakan untuk mengukur rotasi optik suatu zat optik, yaitu senyawa/zat yang mempunyai kemampuan memutar polarisasi sinar terpolarisasi yang melewati larutannya. Penentuan keaktifan optik ini dapat dipergunakan dalam:

- Identifikasi
- Pengujian kemurnian
- Penetapan kadar

Prinsipnya adalah mengukur sudut pemutaran (sudut rotasi) bidang polarisasi yang terjadi jika sinar terpolarisasi dilewatkan melalui larutan setebal 1 dm yang mengandung 1 gram zat/ml, yang diukur dengan menggunakan sinar lampu antrium dengan panjang gelombang 589,3 nm. (pada umumnya pengukuran dilakukan pada suhu 20°C).

Alat ini terdiri dari :

- Sumber cahaya (L)
- Prisma polarisasi (P)
- Tabung/sel polarimeter (T)
- Prisma analisa (A)
- Penginderaan / medan observasi (O)



GAMBAR SKEMA POLARIMETER

Mekanisme Kerja Alat :

Jika A dipasang seperti P, maka berkas sinar yang keluar dari P akan lewat langsung dan A ke okuler O, sehingga O menjadi terang. Jika A diputar 90^0 maka berkas dari P akan ditutup sehingga O menjadi gelap. Tetapi jika pada T ditempatkan suatu senyawa yang mampu memutar bidang polarisasi cahaya yang keluar dari P maka bidang vibrasi cahaya dari A tidak akan sejajar ataupun tegak lurus dengan bidang vibrasi cahaya dari P, sehingga tidak gelap juga tidak terang. Kemudian kita dapat memutar A beberapa derajat dengan tujuan untuk mengembalikan keadaan gelap atau terang yang jelas pada O.

Sudut atau besarnya pusaran itu akan sama dengan sudut rotasi optik dan senyawa yang ada pada T.

Perhitungan rotasi jenis :

A. Rotasi jenis senyawa cair :
$$[\alpha]_D^t = \frac{\alpha}{l \cdot d}$$

dimana α = rotasi optik yang diamati

I = panjang tabung polarimeter

d = rapat masa

II. Rotasi jenis larutan senyawa aktif-optik :

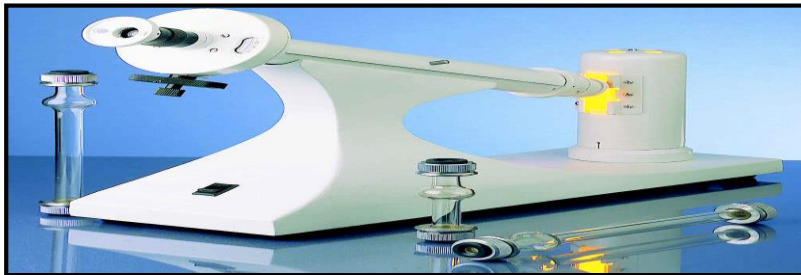
$$[\alpha]_D^t = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

dimana c adalah konsentrasi zat (% b/v)

Prosedur pemakaian alat

1. Siapkan larutan/senyawa yang akan ditentukan rotasi jenisnya.
2. Letakkan polarimeter diatas meja, perhatikan horizontalitasnya. Nyalakan lampu Natrium, atur posisi lampu agar cahaya yang masuk tepat sekali.
3. Ambil tabung polarimeter, bersihkan dan lap dengan kertas lensa. Ukur rotasi udara dengan meletakkan tabung kosong pada tempat tabung. Tentukan rotasi optiknya minimum lima kali.

4. Masukkan Larutan/senyawa yang akan ditentukan rotasi jenisnya ke tabung polarimeter sampai tepat penuh. hindarkan adanya gelembung udara, tutup rapat dan letakkan tabung pada tempatnya.
5. Amati melalui okuler alat, putar skala sampai tidak terdapat lagi perbedaan gelap-terang (sama terangnya).
Baca dan catat besarnya sudut rotasi optik
6. Ulangi keadaan diatas beberapa kali, misalnya tiga kali dengan memutar skala ke arah jarum jam dan tiga kali ke arah yang berlawanan. Ambil rata-rata dan hasil pengamatan tersebut.



GAMBAR POLARIMETER

Latihan

1. Jelaskan Prinsip dari alat potensiometer dan turbidimeter
2. Jelaskan prinsip dari polarimeter
3. Jelaskan tujuan dan kegunaan dari alat potensiometer, turbidimetr serta polarimeter
4. Bagaimanakah cara mengkalibrasi alat turbidimeter

BAB 10 REFRAKTOMETER

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui penggunaan manfaat dan kegunaan dari alat refraktometer
2. Mengetahui prinsip dari refraktometer

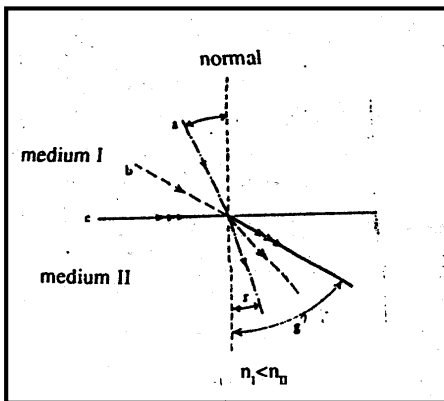
B. Pendahuluan

Refraktometer adalah alat untuk mengukur indeks bias/REFRACTION INDEX. pengukuran bias suatu zat cair ini untuk penilaian sifat dan kemurnian cairan mengukur konsentrasi larutan, mengetahui perbandingan komponen dalam 2 zat cair

Keuntungan menggunakan refraktometer :

- pengerjaannya cepat
- contoh yang dipergunakan sedikit (kurang lebih 0,1 ml).
- ketelitiannya cukup tinggi.

Apabila cahaya monokromatik berpindah dari medium optik yang kurang rapat ke medium optik yang lebih rapat. akan terjadi pembiasan ke arah normal(Lihat gambar 1)



GAMBAR 1

Pembiasan sinar oleh medium optik yang lebih rapat

Menurut hukum Snellius :

$$\frac{\sin i}{\sin r} = \frac{n II}{n I}$$

Bila sudut i bertambah besar, sudut r juga akan bertambah besar sudut r akan mencapai harga maksimum bila sudut i menjadi hampir sama dengan sudut siku-siku (Sinar C)

Karena $\sin 90 = 1$, maka $\sin I$ dan $\sin I$ mendekati harga 1. maka persamaan Snellius menjadi

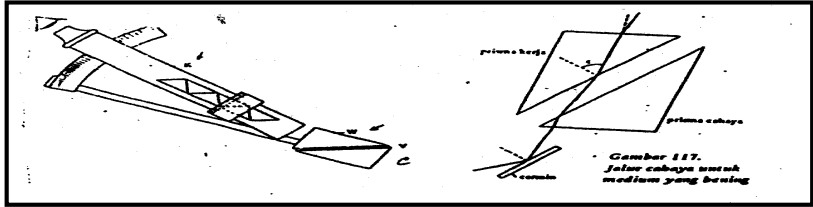
$$\frac{1}{\sin r} = \frac{n_{II}}{n_I} \text{ atau } \sin r = \frac{n_I}{n_{II}}$$

Garis batas antara gelap dan terang dengan menjatuhkan sinar dan medium I dengan indeks bias n_I yang harus diukur menelusuri bidang batas kepada prisma II dengan indeks bias n_{II} yang diketahui. harga n_{II} lebih besar dan harga n_I

A. Refraktometer Abbe :

Prinsip semua Refraktometer menurut bentuk dasar yang dirancang oleh Abbe. Prinsip kerja :

1. Sebuah teropong diarahkan pada salah satu bidang prisma (prisma kerja w).
2. Pada waktu pengukuran, bidang w yang kedua ditutupi dengan cairan yang harus diukur V . yang membentuk lapisan tipis diantara w dan prisma cahaya c .
3. Masing-masing prisma (w dan c) mempunyai montur tersendiri kedua montur dihubungkan dengan engsel.
4. Pada salah satu bidang. masukan cairan cahaya yang akan diukur. Tutup kembali prisma itu sehingga cairan akan membentuk lapisan tipis.
5. Ukur cahaya yang masuk melalui prisma cahaya yang hanya bisa dilewati I batas antara cairan dan prisma kerja dengan sudut yang terletak dalam batas-batas tertentu.



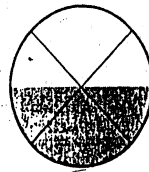
GAMBAR II. SKEMA REFRAKTOMETER ABBE.

6. Amati bidang yang terang dan bidang yang gelap yang terpisah menurut garis yang jelas (gb III).

Tempat perbatasan ini bergantung pada refraksi indeks cairan.

Gambar III.

Bundaran gambar (teropong) pada refraktometer Universal, perbatasan



“gelap terang” telah disetelkan kepada titik potong garis silang

BAB 11 MIKROSKOP

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai materi ini maka diharapkan mahasiswa mampu:

1. Mengetahui bagian-bagian dari mikroskop
2. Mengetahui fungsi dari bagian bagian mikroskop
3. Mengetahui cara pemeliharaan mikroskop yang baik dan benar

B. Pendahuluan

Penggunaan dan perawatan mikroskop

Mikroskop merupakan alat yang sangat vital bagi laboratorium, baik laboratorium Mikrobiologi, Biologi, Klinik, Forensik, Kimia dsb. Alat ini terutama digunakan untuk melihat benda-benda yang sangat kecil yang tidak terlihat oleh mata manusia. Misalnya untuk melihat struktur sel, jaringan, bentuk hablur dsb.

1. Prinsip Kerja

Secara umum prinsip kerja mikroskop yaitu :

Cahaya ditangkap oleh cermin kemudian diteruskan oleh lensa objektif melalui kondensor, membentuk medan terang mengenai objek dan difokuskan oleh lensa objektif membentuk bayangan kemudian bayangan tersebut diperbesar oleh lensa okuler.

2. Komponen/ bagian-bagian

Bagian- bagian Mikroskop & Fungsinya

a. Lensa Okuler

Ada 4 macam pembesaran yang umumnya dipakai yaitu : 5x, 10x, 12x, 15x dan lensa okuler ini langsung berada dekat dengan mata.

Fungsi : Untuk memperbesar bayangan yang diterima dari lensa objektif.

b. Knop pengatur kasar (Makrometer)

Fungsi : Untuk menaikkan atau menurunkan tubus secara kasar

c. Knop pengatur halus (Mikrometer)

Fungsi : Untuk memperjelas gambar objek yang diamati

- d. Pengatur pentas mekanik
Fungsi : Untuk mengatur pentas mekanik yang agak longgar
- e. Pegangan Mikroskop
Fungsi : Untuk memegang mikroskop
- f. Knop pengatur kondensor
Fungsi : untuk mengatur kondensor agar bekerja dengan baik
- g. T u b u s
Fungsi : Untuk menghubungkan lensa objektif dengan lensa okuler
- h. Revolver
Fungsi : sebagai tempat melekatnya lensa objektif
- i. Lensa Objektif
Lensa Objektif adalah lensa yang berada dekat dengan benda yang akan diamati. Ada 3 macam pembesaran yang umumnya dipakai yaitu : Pembesaran 10x, 40x, 100x.
- j. Kondensor
Terletak diantara meja spesimen dan sumbu cahaya dapat dinaikan dan di turunkan.
Fungsi : Untuk mengatur fokus supaya cahaya jatuh tepat ke objek
- k. Diafragma
Terletak dibawah kondensor.
Fungsi : untuk mengatur banyaknya cahaya yang diperlukan.
- l. Cermin Cekung
Fungsi : Untuk menangkap cahaya matahari yang berwarna putih
- m. Alas / Kaki
Bagian dasar dari mikroskop.
Fungsi : Untuk menyangga mikroskop agar dapat berdiri tegak.

Jenis- jenis Mikroskop

- Berdasarkan jumlah lensa mata (Eye Piece)
 1. Mikroskop Monokuler ; Mikroskop ini memiliki satu lensa okuler
 2. Mikroskop Binokuler; Mikroskop ini memiliki dua lensa okuler

- Berdasarkan kegunaan / pemakaian mikroskop

1. ***Bright Field Microscope (Mikroskop Lintang Pandangan terang = Mikroskop Biasa).***

Pada Mikroskop ini sumber cahaya berasal dari belakang objek sebelum mencapai retina sehingga akan tampak objek yang lebih gelap dibanding dengan sekitarnya yang terang.

Cara Kerja :

Arahkan cahaya yang masuk ke mikroskop dengan cara mengatur letak cermin. Dalam pengaturan cahaya ini, biarkan posisi kondensor setinggi-tingginya. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemakaian cermin ini ialah :

Bila anda memakai sinar matahari maka harus memakai cermin datar. Bila anda memakai sinar lampu maka harus memakai cermin cekung. Apabila sudah memperoleh cahaya secara maksimum, kemudian aturlah banyaknya cahaya tersebut menurut kebutuhan sebagai berikut :

sediaan dengan sedikit kontras, misalnya tinja basah, sedimen air, air kencing dan lain sebagainya. Maka kurangilah cahaya dengan cara menurunkan kondensor atau mengecilkan diafragma.

Sediaan dengan banyak kontras, misalnya sediaan darah yang diwarnai maka cukuplah cahaya dengan cara meninggikan kondensor atau membesarkan diafragma sehingga cukup terang (tetapi jangan sampai silau)

2. ***Mikroskop Phase Kontras***

Mikroskop fasa mempunyai kelebihan dimana gelombang cahaya berjalan melewati objek transparan seperti sel kemudian memberikan fasa yang berbeda tergantung sifat objek yang dilewati. Sistem optik khusus mengubah perbedaan fasa menjadi perubahan intensitas, sehingga suatu struktur internal yang bisa dibedakan dalam sel hidup, sedangkan jika menggunakan mikroskop biasa objek harus dimatikan dan diwarnai terlebih dulu. Komponen

mikroba yang ada dalam sel mikroba akan terlihat lebih jelas, karena ada perbedaan daya serap, daya pantul atau daya refraksi cahaya dari komponen yang terdapat pada sel mikroskop yang akan memberikan adanya kontras antara komponen sel yang satu dengan komponen sel lainnya. Mikroskop konfokal telah memberikan kontribusi yang berarti bagi dunia biologis sel.

3. *Mikroskop Fluorescent*

Teknik mikroskop fluorescent sering digunakan untuk mengamati bakteri tuberkulosa dengan menggunakan zat warna fluorescent auramin. Bakteri yang dengan warna pendar (fluorescent dye) akan berwarna lain dibawah mikroskop pendar dari pada bila dilihat dibawah mikroskop cahaya biasa. Kualitas yang dikenal fluorescent dapat diamati dengan adanya cahaya ultraviolet. *Micobacterium tuberculosis* yang diwarnai dengan zat auramin (warna kuning) akan tampak cemerlang pada latarbelakang yang gelap, karena kebanyakan bakteri tidak dapat diwarnai dengan pewarnaan ini, maka prosedur ini sangat bermanfaat untuk identifikasi bakteri tuberkulose. Mikroskop fluorescent dapat juga digunakan untuk mendeteksi benda asing atau antigen (seperti bakteri, rickettsiae, atau virus) dalam jaringan.

4. *Dark Field Mikroskop (Mikroskop Lintang Pandangan Gelap)*

Dark Field Mikroskop sama dengan Bright Field Mikroskop hanya saja dilengkapi dengan lensa kondensor (untuk memusatkan cahaya agar menuju objek) dan suu lempeng untuk membatasi cahaya yang menuju objek (Stop-Ring). Dengan Dark Field Mikroskop objek akan terlihat terang sedangkan latar belakangnya gelap. Dark Field mikroskop biasa digunakan untuk melihat bakteri “*Treponema Palidum*” (Penyebab Syphilis). Encahayaan pada mikroskop lapangan gelap diperoleh dengan menggunakan kondensor khusus yang menghalangi jalannya

sinar langsung maupun cahaya yang dipantulkan oleh cermin disebelah kondensor dengan arah miring.

5. ***Nomarski Interference Contrast Microscope (Mikroskop Nomarski)***

Mikroskop Nomarski mempergunakan dua sumber cahaya untuk memanfaatkan perbedaan indeks refraksi dari komponen-komponen yang ada didalam sel mikroba. Dengan mikroskop nomarski objek terlihat secara tiga dimensi.

6. ***Mikroskop Elektron***

Kemampuan pengamatan yang tinggi dari mikroskop telah memungkinkan ilmuwan untuk melihat struktur detail dari sel Prokariota dan Eukariota. Keunggulan daya lihat mikroskop elektron adalah karena elektron memiliki panjang gelombang yang jauh pendek dari pada foton cahaya.

Ada dua jenis Mikroskop Elektron yang umum digunakan yaitu

:

1. TEM (Transmission Electron Microscope)

TEM merupakan mikroskop Elektron yang pertama dikembangkan dan menggunakan sinar elektron yang ditembakkan dari sebuah sumber elektron dan diarahkan atau difokuskan oleh lensa kondensor elektro magnetik pada spesimen yang tipis. Ketika elektron mengenai spesimen elektron disebarkan oleh sejumlah atom dalam spesimen. Elektron menembus melewati spesimen kemudian dikumpulkan dan difokuskan oleh lensa objektif elektro magnetik, membentuk bayangan spesimen pada sistem lensa proyektor dan kemudian diperbesar lagi. Bayangan diperlihatkan pada layar yang berfluoresensi jika terkena elektron, bayangan ini dapat direkam dalam film fotografi.

2. SEM (Scanning Electron Microscope)

SEM umumnya memiliki daya lihat yang lebih rendah daripada TEM namun demikian tetap berguna. Khususnya

untuk mendapatkan bayangan tiga dimensi permukaan objek mikroskopi. Elektron difokuskan oleh lensa pada titik yang sangat kecil, interaksi elektron dengan spesimen menghasilkan radiasi dalam bentuk lain dari permukaan benda yang dapat ditangkap oleh detektor yang sesuai, diperbesar dan ditampilkan oleh layar TV.

7. ***Mikroskop Inversi***

Dipergunakan untuk keperluan rutin dan riset. Mikroskop ini didesain untuk melakukan pekerjaan dan pemeriksaan rutin. Pada sampel cair dalam wadah yang biasa digunakan dilaboratorium, misalnya : labu erlemeyer, cawan petri, tempat uji mikroskop bejana plankton, botol media dsb. Mikroskop ini terutama sangat cocok dipergunakan untuk keperluan laboratorium klinik, medik, kimia, farmasi, hidrologi, biologi, ekologi dan makanan.

8. ***Mikroskop Riset Metalurgi***

Dipergunakan untuk laboratorium mineralogi, metalurgi, untuk menguji logam-logam, batu-batuan yang bersifat non destruktif, keramik, tekstil, resin sintetik, bahan yang bersifat semi konduktif dalam medan elektrik dsb.

9. ***Mikroskop stereo***

Dengan menggunakan mikroskop stereo kita dapat melihat objek dengan lebih baik, jelas, jernih, dan seolah-olah objek yang dilihat sebagai benda yang timbul. Adapula yang dilengkapi dengan lensa tipe zoom.

10. ***Mikroskop Perbandingan***

Bayangan dibuat oleh dua buah mikroskop yang identik dan berdiri sendiri kemudian dikombinasi didalam lensa mata tunggal. Alat ini dipergunakan untuk mencocokkan atau membandingkan objek dari sampel dengan objek yang telah diketahui.

BAB 12

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

A. Tujuan Pembelajaran

Setelah selesai pembelajaran ini mahasiswa dapat

1. Mengetahui tentang *Polymerase Chain Reaction (PCR)*
2. Mengetahui prinsip kerja dari *Polymerase Chain Reaction (PCR)*
3. Mengetahui tahapan tahapan prosedur dari *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

B. Pendahuluan

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi berantai *polymerase* adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. PCR ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis. Metode PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA sebanyak ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar $10^6 - 10^7$. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap n siklus PCR akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non target (Fatchiyah, 2011).

Metode ini sekarang telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitasi molekul mRNA.

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik yang dapat memperbanyak jutaan urutan DNA spesifik hanya dalam waktu yang singkat. Teknik ini ditemukan oleh Kary B. Mullis pada tahun 1983. PCR adalah suatu reaksi untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut dengan bantuan

enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam satu thermocycler (Yuwono, 2006). Materi awal untuk PCR adalah suatu larutan DNA dari untai ganda yang mengandung urutan nukleotida yang ditargetkan untuk disalin. Proses amplifikasi dapat dicapai dengan memanfaatkan dua primer oligonukleotida sintetik, enzim DNA polymerase termostabil dan *deoxynucleotide triphosphate* (dNTP) yang mencakup dATP, dCTP, dGTP dan dTTP yang bekerja pada untaian DNA (Campbel, 1999).

PCR melibatkan tiga tahapan siklus temperatur yang berurutan yaitu denaturasi template, annealing (penempelan) pasangan primer pada untai ganda DNA target dan pemanjangan (Yuwono, 2006).



Alat PCR

Prinsip kerja PCR adalah sebagai berikut:

- 1) Tahap denaturasi, berlangsung pada suhu tinggi 94-96⁰C untuk memisahkan kedua untai DNA secara sempurna melalui pemutusan ikatan Hidrogen nukleotida sehingga terbentuk dua untai tunggal DNA.
- 2) Tahap penempelan primer/annealing, suhu diturunkan 45-60⁰C (tergantung primer yang digunakan) sehingga primer menempel pada bagian DNA templat yang komplementer urutan basanya
- 3) Tahap pemanjangan/ekstensi, apabila suhu dinaikkan kembali menjadi 70-75⁰C maka primer dengan bantuan enzim DNA polymerase akan membentuk untai DNA yang baru.

Apabila ketiga tahap dalam proses PCR telah dilakukan maka setiap satu segmen DNA untai ganda diamplifikasi menjadi 2 segmen DNA untai ganda yang identik, sehingga jumlahnya menjadi dua kali lebih banyak, siklus diulangi kembali dari awal, demikian seterusnya hingga siklus selesai (Diffenbach, 1995).

Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi, hal ini berdasarkan spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi produk sesuai yang diinginkan. Efisiensi PCR adalah kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan yang tinggi karena DNA polymerase mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk (Mordechai, 1999). Melalui PCR identifikasi mikroorganisme pada sampel dapat dilakukan dengan cepat dan dapat dipercaya untuk mendiagnosa secara molekuler berbagai macam penyakit infeksi dimana metode kultur dan serologi sering terhambat dengan sedikitnya jumlah sampel (Bopp, et al., 2003).

Metode PCR tersebut sangat sensitif. Sensitivitas tersebut membuatnya dapat digunakan untuk melipatgandakan satu moleku DNA, metode ini juga sering digunakan untuk memisahkan gen – gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuen genom. Dengan menggunakan metode PCR, dapat diperoleh pelipatgandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{-19} mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit. Hal ini menunjukkan bahwa pelipatgandaan suatu fragmen DNA dapat dilakukan secara cepat, kelebihan lain metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, serta DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuen DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampurkan kultur bakteri di dalam tabung PCR (Triwibowo, 2006).

1. *Ekstraksi Deoxyribon Nucleic Acid (DNA)*

Ekstraksi DNA merupakan serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya. DNA atau asam deoksiribosa merupakan tempat penyimpanan informasi genetik. Sebuah sel memiliki DNA yang merupakan materi genetik dan bersifat herediter pada seluruh sistem

kehidupan. Genom adalah set lengkap materi genetik (DNA total) yang memiliki suatu organisme dan terorganisasi menjadi kromosom. DNA pada organisme tingkat tinggi seperti manusia, hewan dan tumbuhan terdapat di dalam inti sel, dan di beberapa organel di dalam sel, seperti mitokondria dan kloroplas. DNA inti (genom inti) berasal dari inti sel, sedangkan DNA mitokondria (genom mitokondria) berasal dari mitokondria, dan DNA kloroplas berasal dari kloroplas. Pada organisme tingkat rendah, DNA penyusun kromosom dan plasmid dibungkus oleh dinding sel (pada bakteri) atau dibungkus oleh protein tertentu pada virus (Endik, 2016)

Isolasi DNA merupakan tahap pertama dari berbagai teknologi analisis DNA. DNA dapat ditemukan baik pada kromosom inti maupun pada organel, yaitu pada mitokondria dan kloroplas. Untuk mengekstrak DNA, sel dan membran inti, yang dilanjutkan dengan pemisahan DNA dari berbagai komponen sel yang lain. Pada saat melakukannya, DNA harus dijaga agar tidak rusak dan didapatkan DNA dalam bentuk rantai yang panjang (Fatchiyah, 2011).

Prinsip dasar isolasi DNA adalah lisis sel (melisiskan DNA dari nucleus), penghilangan protein dan RNA (Asam Ribonukleat), pengendapan DNA/presipitasi DNA, pencucian DNA dari protein dan RNA (kontaminan) serta permanenan DNA. Tujuan dilakukannya isolasi DNA adalah diperolehnya DNA total (*genome*) dengan konsentrasi tinggi dan bersih dari kontaminan. Berbagai teknik dasar untuk ekstaksi DNA telah dikembangkan. Isolasi DNA dapat dilakukan secara manual dan dengan bantuan KIT. Kedua cara tersebut memiliki prinsip dasar yang sama. Untuk memperoleh isolasi DNA dari sampel yang diekstraksi, ada beberapa hal yang harus diperhatikan dengan benar, yaitu (Endik, 2016) :

a. Tahapan pemecahan dinding sel atau jaringan yang akan diisolasi DNA – nya, seperti : sel darah merah, dan jaringan hewan. Jaringan hewan dapat dipecah dengan dua cara, yaitu :

1) Secara fisik : sel dipecah dengan kekuatan mekanik

- 2) Secara kimiawi : sel dirusak dengan buffer lisis sel yang berfungsi untuk merusak integritas barrier dinding sel.

Contoh senyawa kimia yang digunakan untuk penghancuran sel adalah EDTA (Etilen Diamin Tetra Acetat) dan SDS (Sodium Deodesil Sulfat). EDTA berfungsi sebagai perusak sel dengan cara mengikat magnesium (ion ini berfungsi untuk mempertahankan integritas sel maupun mempertahankan aktivitas enzim nuclease yang merusak asam nukleat). SDS merupakan sejenis detergen yang berfungsi untuk merusak membran sel.

- b. Debris sel dipisahkan dari larutan DNA.
- c. Presipitasi RNA dan protein agar diperoleh DNA yang murni.
- d. Presipitasi DNA, dilakukan dengan penambahan etanol 96% dingin atau dengan isopropanol.
- e. Pemurniaan DNA dari debris sel, dengan pemberian fenol, fenol : kloroform, fenol : kloroform : isoamil alcohol atau jika menggunakan kit ekstraksi DNA tahap ini dilakukan dengan penambahan *wash buffer*.

2. Amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction*

Penemuan awal dari teknik PCR didasarkan pada tiga *waterbaths* yang mempunyai temperatur yang berbeda. *Thermal-cycler* pertama kali dipublikasikan pada tahun 1986, akan tetapi *DNA polymerase* awal yang digunakan masih belum *thermostable*, dan harus ditambahkan disetiap siklusnya. Kelemahan lain temperature 37°C yang digunakan bias dan menyebabkan *non – specific priming*, sehingga menghasilkan produk yang tidak dikehendaki. *Taq DNA polymerase* yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus (Taq)* dikembangkan pada tahun 1988. Enzim ini tahan sampai temperatur mendidih 100°C, dan aktifitas maksimal pada temperatur 92 – 95°C.

Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang meliputi denaturasi, annealing dan ekstensi oleh *enzim DNA polimerase*. Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hibrid

dengan ujung-5' menuju ujung-3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan.

Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA (Fatchiyah, 2011) :

a. Denaturasi

Denaturasi DNA template (cetakan) sehingga rantai DNA yang berantai ganda (*double stranded*) akan terpisah menjadi rantai tunggal (*single stranded*). Denaturasi DNA dilakukan dengan menggunakan panas (95°C) selama 1 – 2 menit.

b. *Annealing* (penempelan primer)

Kemudian suhu diturunkan menjadi 65°C sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. Primer akan membentuk jembatan hydrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Suhu 65°C yang digunakan untuk penempelan primer pada dasarnya merupakan kompromi. Amplifikasi akan lebih efisien jika dilakukan pada suhu yang lebih rendah (37°C), tetapi biasanya akan terjadi mispriming yaitu penempelan primer pada tempat yang salah. Pada suhu yang lebih tinggi (65°C), spesifisitas reaksi amplifikasi akan meningkat, tetapi secara keseluruhan efisiensinya akan menurun.

Primer yang digunakan dalam PCR ada dua yaitu oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5' – fosfat dan oligonukleotida yang kedua identik dengan sekuen pada ujung 3' – OH rantai DNA cetakan yang lain. Proses *annealing* dilakukan biasanya 1-2 menit.

DAFTAR PUSTAKA

- Astrawinata DAW, *Buku kumpulan makalah Lokakarya prinsip dasar dan penggunaan praktis instrument laboratorium*, Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia , Jakarta 2004
- Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, et. al. *Biologi*. 5 thed . Jakarta. Penerbit Erlangga ; 2004
- Collins, C. H., P. M. Lyne, J. M. Grange, dan J. O. Falkinham III. 2004. *Microbiological Methods Eight Edition*. Oxford University Press Inc. New York
- Fatchiyah, Estri Laras Arumingtyas, Sri Widyanti, Sri Widyanti, Sri Rahayu, 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. Malang
- Gandjar, Ibnu Gholib. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar
- Harley and Presscot. 2002. *Laboratory Exercise in Microbiology*. USA
- Instrumen Labkes Depkes Pusat Pendidikan Tenaga Kesehatan*, Jakarta, 1995.
- Pusdiknakes, *Instrumen Laboratorium Kesehatan*, Departemen Kesehatan, Jakarta 1995
- Lokakarya Prinsip Dasar dan Penggunaan Praktis Instrumen Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran UI*, Jakarta, 2004.
- Subroto Joko, ***Buku Pintar Alat-Alat Laboratorium***, CV. Aneka, Solo 2000
- WHO, ***Basics of Quality Assurance for Intermediats and Peripheral Laboratories***, 1992.
- Wunas, Yeanny dan Susanti. 2011. *Analisa Kimia Farmasi Kuantitatif (revisi kedua)*. Makassar : Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi UNHAS