

ANALISIS ASAM AMINO DENGAN KROMATOGRAFI CAIRAN KINERJA TINGGI SECARA DERIVATISASI PRAKOLOM DAN PASCAKOLOM

Oleh: *Wayan Rediatning S**, dan *Nanny Kartini H.**

ABSTRACT

Through an experiment process, an optimum condition of amino acid analysis using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with post- and pre-column derivatization methods has been found.

The optimum condition of the analysis for the post-column derivatization was obtained by using resin cation exchanger ($R-SO_3 Na^+$) as the column, citric acid buffer of the pH 3,0 and boric acid buffer of the pH 9,7 as the mobile phase, and O-phthalaldehyde (OPA) /2-mercaptoethanol as the derivator.

In the pre-column derivatization method, Resolve 5μ spherical C18 was used as the column, solution A (methanol : THF : $H_2O = 2 : 2 : 96$) which contains 0.05 M Na_2HPO_4 and 0.05 M NaOAc) and solution B (methanol : $H_2O = 65 : 35$) as the mobile phase, and OPA/ethantiol as the derivator.

Each of both HPLC methods can separate more than 17 kinds of amino acids. The result shows that the pre-column derivatization method was more sensitive and took a shorter analysing time than the post-column derivatization method; however, secondary amino acid could not be determined by the first method.

SARI

Telah dilakukan percobaan untuk mencari kondisi optimum proses analisis asam amino dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) secara derivatisasi prakolom dan pasca-kolom.

Kondisi analisis optimum untuk cara derivatisasi pascakolom diperoleh dengan menggunakan resin penukar kation ($R-SO_3 Na^+$), larutan dapar sitrat pH 3,0 dan larutan dapar borat pH 9,7 sebagai fase gerak, serta O-ftalaldehida (OPA)/2-merkaptioetanol sebagai penderivatisasinya.

Untuk cara derivatisasi prakolom, sebagai kolom digunakan Resolve spherical C18, sebagai fase gerak digunakan larutan A yang terdiri dari metanol : THF : air (2:2 : 96) yang mengandung 0,05 M Na_2HPO_4 dan larutan B yang terdiri dari metanol : air (65 : 35), sedangkan sebagai zat penderivatisasi digunakan OPA/etantiol.

* Pusat Penelitian Teknik Nuklir- BATAN, alumni ITB

Kedua metode KCKT ini masing-masing dapat memisahkan 17 macam campuran asam amino. Diketahui bahwa kepekaan cara derivatisasi prakolom lebih tinggi dan waktu analisisnya lebih cepat daripada cara derivatisasi pascakolom, tetapi cara prakolom tidak dapat menentukan asam amino sekunder.

PENDAHULUAN

Asam amino adalah senyawa yang mempunyai rumus umum $^+H_3NCH - (R)COO^-$, bersifat ion dan hidrofil. Asam-asam amino saling berbeda gugus R-nya. Ada sekitar 20 macam asam amino penting yang merupakan pembentuk protein dan disebut asam amino hidrolisat, seperti Alanin (Ala), Arginin (Arg), Sistein (Sis), Glutamin (Gln), Asam glutamat (Glu), Glisin (Gly), Histidin (His), Iso leusin (Leu), Lisin (Lys), Metionin (Met), Fenilalanin (Phe), Prolin (Pro), Serin (Ser), Treonin (Thr), Triptofan (Trp), Tirosin (Tyr), dan Valin (Val).

Analisis asam amino ini sangat diperlukan, misalnya untuk menganalisis hasil industri seperti makanan, makanan ternak, obat-obatan, juga untuk analisis cairan biologi dan hidrolisat protein.

Cara analisis asam amino yang masih lazim digunakan sampai saat ini adalah kromatografi dengan berbagai macam teknik seperti kromatografi kertas, lapisan tipis, dan kolom. Kromatografi kolom lebih banyak dikembangkan karena selain dapat digunakan untuk keperluan kualitatif juga dapat untuk keperluan kuantitatif dan preparatif. Akan tetapi pada kromatografi kolom biasa (*open column*), diperlukan waktu yang lama untuk memisahkan asam amino secara sempurna. Karena itu perlu ada metode analisis yang dapat memisahkan asam amino tersebut secara sempurna dalam waktu singkat dengan hasil yang tepat dan teliti.

Analisis asam amino dengan kromatografi cair yang menggunakan resin penukar kation sebagai fase diam, pertama kali dikembangkan oleh Willienn Stein dkk. (8) pada tahun 1951, yang kemudian dikembangkan bersama Sparkman (8) menjadi sistem yang otomatis pada tahun 1958. Akan tetapi metode ini masih sangat rumit, biayanya mahal, dan peralatannya kurang dapat disesuaikan dengan keadaan. Akhir-akhir ini kromatografi cair dengan kinerja tinggi (*High Performance Liquid Chromatography*) banyak digunakan untuk analisis asam amino. Metode ini ditunjang oleh peralatan yang baik dan modern, menggunakan kolom yang sangat efisien dan di bawah tekanan yang besar, sehingga analisis asam amino dapat dilakukan dalam waktu yang singkat dan memberikan hasil yang tepat dan teliti. Percobaan ini dilakukan oleh Pfeifer dkk. pada tahun 1983 (7).

Untuk mendeteksi asam amino dapat digunakan detektor ultra-lembayung, sinar tampak, atau detektor fluoresensi. Dalam hal ini asam amino harus

diderivatisasi terlebih dahulu supaya dapat membentuk derivat yang dapat menyerap cahaya UV, tampak, atau berfluoresensi. Senyawa yang banyak digunakan untuk tujuan ini adalah o-ftalaldehida (OPA)/etantiol (ETSH), dan OPA/2-merkaptotanol (2-ME). Pereaksi ini dengan asam amino dapat membentuk derivat iso-indol yang berfluoresensi kuat, sehingga dapat terdeteksi oleh detektor fluoresensi.

Ada 2 macam cara derivatisasi, yaitu derivatisasi pascakolom dan derivatisasi prakolom (4, 5, 6). Pada cara derivatisasi pascakolom, mekanisme pemisahan asam amino adalah terjadinya penukaran ion antara gugus amino yang terprotonasi dengan ion Na^+ dari resin penukar kation ($\text{R}-\text{SO}_3-\text{Na}^+$) pada pH rendah.

Bila pH fase gerak dinaikkan secara gradien kontinu, protonasi asam amino akan berkurang, yang menyebabkan asam amino akan terelusi berturut-turut sesuai dengan derajat protonasinya, dan hal ini berkaitan dengan pH isoelektrik asam amino tersebut. Asam amino yang mempunyai pH isoelektrik rendah akan terelusi lebih dahulu (4, 5, 6).

Dalam teknik derivatisasi prakolom, mekanisme pemisahan adalah partisi dengan sistem kromatografi fase balik (*reverse phase chromatography*). Asam amino primer akan bereaksi secara spesifik dan selektif dengan OPA/2-ME atau OPA/ETSH. Terbentuk suatu derivat yang selain berfluoresensi kuat juga bersifat hidrofob yang memungkinkan terjadinya pemisahan secara kromatografi fase balik menggunakan kolom nonpolar dan fase gerak yang polar (4, 5, 6). Asam amino terderivatisasi yang mempunyai kepolaran tinggi akan terelusi lebih dahulu. Dalam percobaan ini dicari kondisi pemisahan yang baik dengan menggunakan kedua metode di atas, dan dicoba menganalisis asam amino dari beberapa cuplikan seperti makanan temak, bir, dan berem.

BAHAN DAN TATA KERJA

Bahan dan peralatan

Bahan terdiri atas asam amino baku buatan Sigma, BRIJ 30 (*Polyoxy ethylene lauryl ether*) buatan Pierce, natrium sitrat, asam borat buatan Univar, Ajax chemical, 2-merkaptotanol (Sigma), o-ftalaldehida (Pierce), dan pereaksi yang lain buatan E. Merck. Semua pereaksi yang digunakan mempunyai tingkat kemurnian pro analisis. Selain itu digunakan juga plasma tikus, makanan ayam, dan bir. Air yang digunakan adalah air yang telah dilewatkan Milli Q system.

Peralatan yang digunakan adalah KCKT (Waters, Model 244) yang dilengkapi dengan detektor fluoresensi (Model 420-AC, eksitasi = 334 nm, dan emisi = 425 nm), *Automated Gradient Controller* (Waters, Model 680), Data Modul (Waters, Model 730), *Amino Acid Analysis Column*TM (Waters), *Resolve*TM 5 μ Spherical C₁₈ (3,9 mm I.D x 15 cm) Radial Pak μ Bondapak C₁₈ (8 mm I.D x 10 cm) dari Waters, alat vakum, oven, dan lampu infra merah.

Tata kerja

a Penyediaan larutan baku

Asam amino baku ditimbang masing-masing 25 mg, kemudian dilarutkan dalam HCl 0,01 M (tirosin dilarutkan dalam dapar fosfat pH = 7,0) sampai volume mencapai 25 ml. Dari masing-masing larutan diambil sejumlah volume tertentu, kemudian diencerkan dengan HCl 0,01 M sampai kadar asam amino 50 nmol/ml untuk cara derivatisasi pascakolom dan 0,5 nmol/ml untuk cara derivatisasi prakolom. Sebelum disuntikkan, semua larutan disaring dengan penyaring milipore ukuran 0,45 μm .

b Penyediaan cuplikan

Untuk analisis asam amino dari makanan ternak, cuplikan harus dihidrolisis dahulu dengan cara sebagai berikut: Makanan ayam ditimbang 10–15 mg, ditambahkan 25 ml HCl 6 N, lalu dimasukkan ke dalam tabung hidrolisis. Cairan dalam tabung dibekukan dengan nitrogen cair atau CO₂ padat (es kering), lalu tabung divakumkan, dan setelah vakum, ditutup kedap. Selanjutnya, tabung dipanaskan di dalam oven pada suhu 110°C selama 6 jam, lalu didinginkan. Setelah itu HCl dihilangkan dengan penguapan di bawah sinar inframerah. Residu yang mengandung asam amino dilarutkan dalam HCl 0,01 M, dan untuk melarutkan tirosinnya digunakan dapar fosfat pH 7,0. Akhirnya larutan disaring dengan penyaring milipore ukuran 0,45 μm .

c Penyediaan larutan dapar

1 Larutan dapar sitrat dibuat dengan melarutkan 19,6 g natrium sitrat dalam air. pH diatur dengan larutan HCl 6 N sampai mencapai 3,0; volume akhir 1 liter.

2 Larutan dapar borat untuk fase gerak

Ke dalam 800 ml air dilarutkan 2,5 g asam borat dan 14,6 g NaCl. pH diatur dengan larutan NaOH 6 N sampai 9,7; volume akhir 1 liter.

3 Larutan sediaan dapar borat

Ditimbang 48 g asam borat, kemudian dilarutkan dalam 1800 ml air dan ditambah 30 g KOH. pH larutan diatur sampai 10,4 dengan larutan KOH 6 N, volume akhir 2 liter.

Semua larutan dapar tersebut kemudian disaring dengan penyaring milipore ukuran 0,45 μm dan diawagaskan (dihilangkan gas yang tertinggal di dalamnya) dengan alat *Ultrasonic bath*; pH ditentukan kembali sebelum dipakai.

d Pembuatan larutan hipoklorit

Larutan sediaan dapar borat diambil 500 ml, ditambah 1 ml larutan Na-hipoklorit 0,5%, kemudian diawagaskan.

e Pembuatan larutan OPA (o-ftalaldehida)

Larutan sediaan dapar borat diambil 500 ml, lalu ditambah 0,2 ml larutan 30% BRIJ 30 dalam air. Di dalam gelas piala kecil ditimbang 350 mg OPA dan dilarutkan dalam 10 ml metanol. Kemudian ditambahkan 2 ml 2-merkaptotanol/etantiol; dilakukan di dalam ruang asam. Larutan OPA-merkaptotanol ini ditambahkan ke dalam larutan borat, kemudian diawagaskan. Larutan ini akan lebih stabil bila disimpan di bawah nitrogen.

f Pembuatan fase gerak A untuk teknik derivatisasi prakolom

Dibuat campuran larutan metanol: THF (tetrahidrofuran): air (2 : 2 : 96) yang mengandung 0,05 M Na₂HPO₄ dan 0,05 M Na-asetat. pH larutan diatur sampai 7,5 dengan menggunakan asam asetat. Kemudian larutan disaring dan diawagaskan.

g Pembuatan larutan penderivatisasi untuk cara derivatisasi prakolom

Ditimbang OPA 50 mg, dilarutkan dalam 4,5 ml etanol, dan ditambahkan 50 μ l 2-merkaptotanol atau etantiol serta 0,5 ml larutan dapar borat.

h Derivatisasi asam amino baku dan cuplikan

Larutan asam amino 250 μ l ditambah 250 μ l larutan dapar borat dan 100 μ l larutan OPA/merkaptotanol. Kemudian larutan diencerkan sampai volume 1 ml dengan metanol, dan dibiarkan bereaksi pada suhu kamar selama 5 menit.

i Clean up cuplikan dengan: SEP-PAK C₁₈ cartridge

Larutan yang dibuat adalah:

Larutan 1 : 0,1% TFA (asam trifluoroasetat) dalam air;

Larutan 2 : 0,1% TFA dalam air : metanol = 80 : 20;

Larutan 3 : 0,1% TFA dalam air : metanol = 70 : 20.

SEP-PAK C₁₈ yang baru, diaktifkan dua kali dengan 10 ml metanol, kemudian dicuci dua kali dengan 10 ml larutan 1. Setelah itu cuci lagi satu kali dengan 10 ml larutan 2.

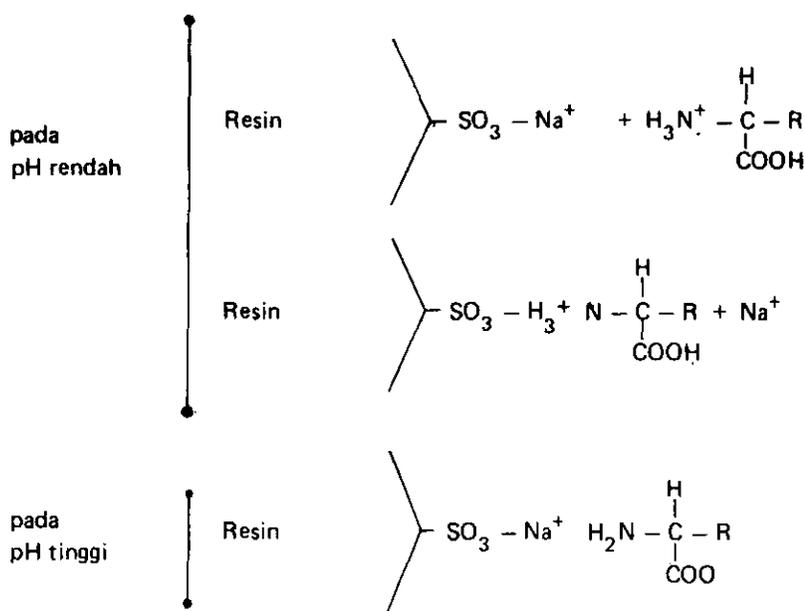
Larutan cuplikan sebanyak 1 ml dicampur dengan 2 ml larutan 3 (larutan harus larut dalam air atau asam dan bebas dari partikel).

Cuplikan dilewatkan melalui SEP-PAK C₁₈ cartridge. Eluat pertama 1 ml dan 2 ml, eluat berikutnya yang mengandung asam amino ditampung.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam analisis asam amino dengan cara derivatisasi pascakolom, derivatisasi dengan OPA/2-merkaptotanol dilakukan setelah asam amino keluar dari kolom dan telah terjadi pemisahan. Karena itu, sebelum masuk ke dalam kolom, asam amino tersebut berada dalam bentuk ion, sehingga mekanisme pemisahan yang cocok adalah penukaran ion dengan menggunakan kolom penukar kation (R-SO₃-Na⁺).

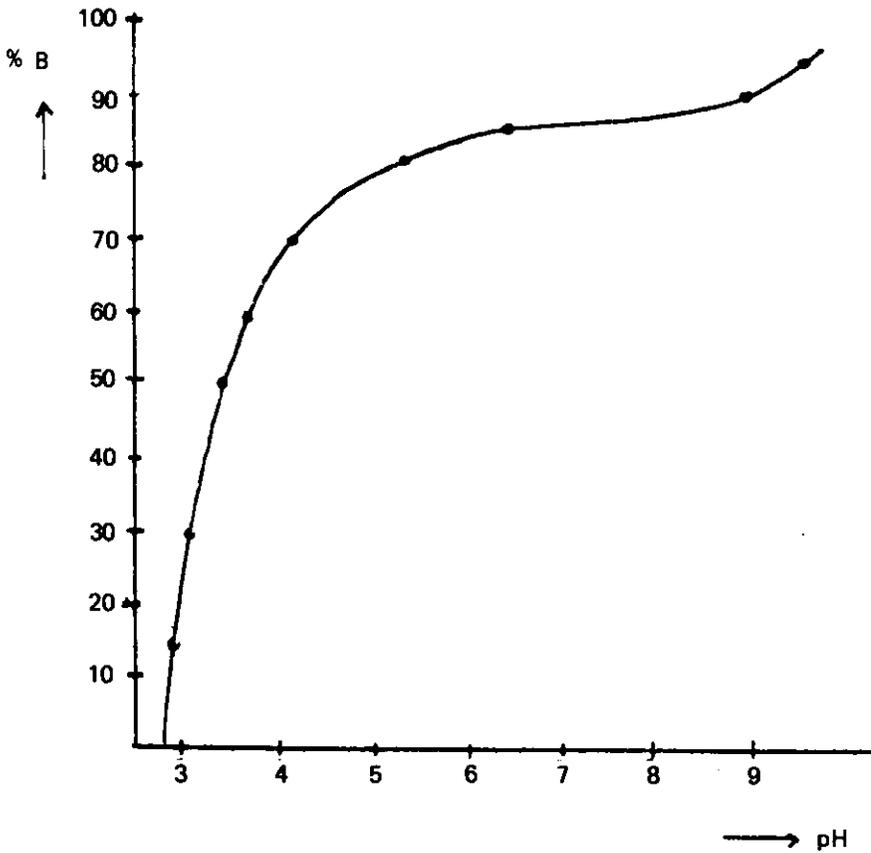
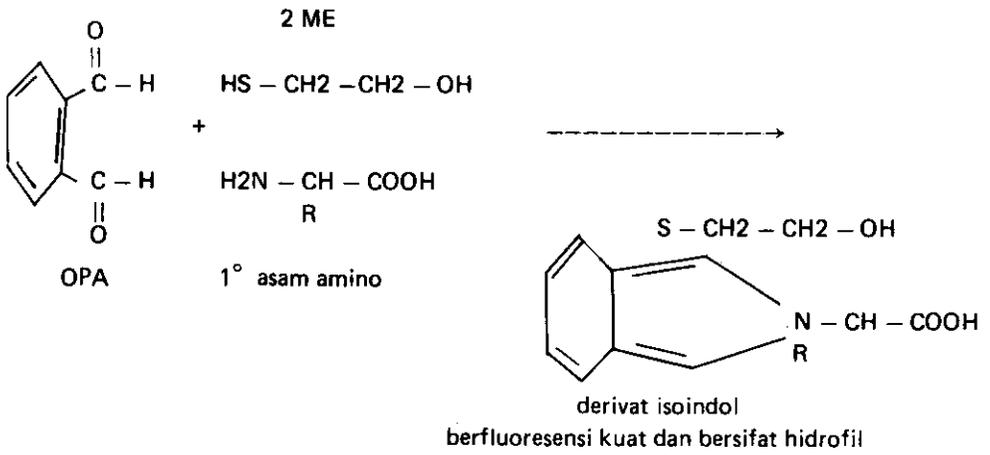
Dalam hal ini, pemisahan dan elusi asam amino didasarkan pada perbedaan pI (pH isoelektrik) asam amino tersebut dan pengaturan pH fase gerak. Pada pH yang rendah (= 3,0) asam amino berada dalam bentuk terprotonasi, sehingga dapat terikat dengan resin penukar kation ($R-SO_3^-$) menggantikan kedudukan Na^+ . Bila pH dinaikkan secara gradien (berangsur-angsur dengan tetap), maka setelah pI di lewati, gugus NH_3^+ dari asam amino tersebut akan berubah menjadi gugus NH_2 yang menyebabkan terlepasnya asam amino dari resin dan terelusi. Makin kecil pI, asam amino makin cepat terelusi. Asam amino yang mempunyai pI yang sama akan terpisah berdasarkan perbedaan ukuran molekul, karena selain mempunyai sifat menukarkan ion, resin yang digunakan juga mempunyai sifat *molecular sieve* (7,8).



Pada pemisahan asam amino dengan mekanisme pemisahan ion, pH memegang peranan penting. Pengaturan pH ini dilakukan dengan mengatur komposisi (perbandingan volume) dapar sitrat (pH = 3,0) dan dapar borat (pH = 9,8) secara gradien kontinu, yang didasarkan pada kurva titrasi dapar sitrat dan dapar borat seperti tertera pada gambar 1.

Untuk menyempurnakan pemisahan asam amino yang keluar terlebih dahulu seperti treonin dan serin, perlu ditambahkan metanol pada dapar sitrat. Hal ini disebabkan treonin dan serin mempunyai pI dan ukuran molekul yang hampir sama tetapi kelarutan dalam metanol berbeda (7).

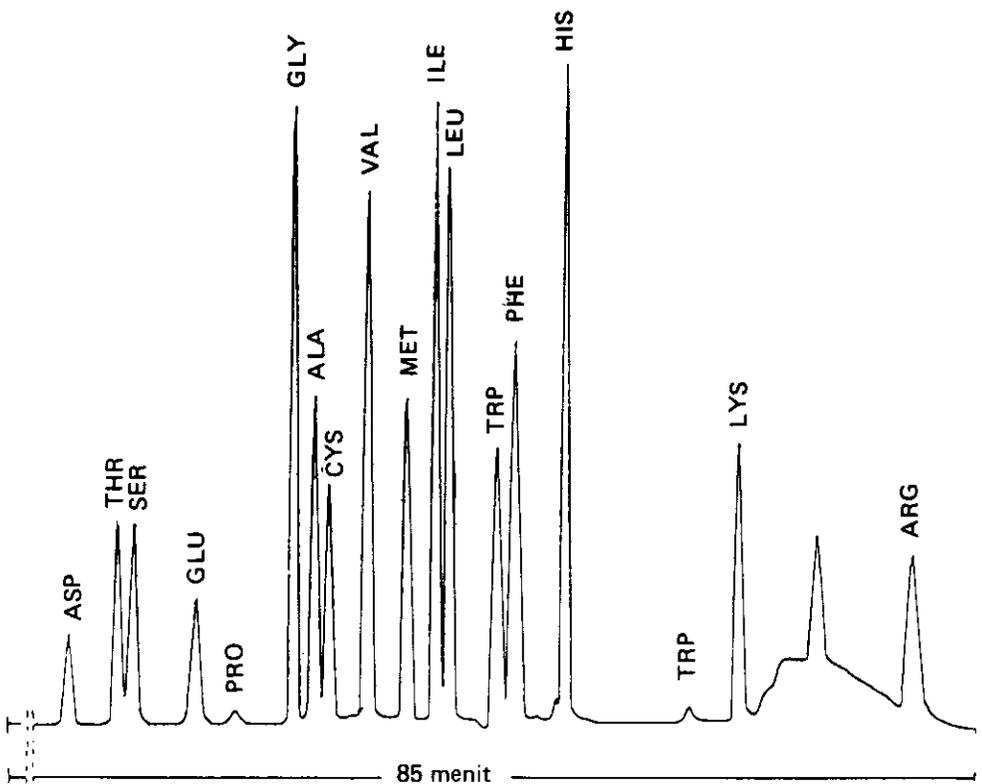
Mekanisme derivatisasi asam amino dengan o-ftalaldehida (OPA)/2-merkaptotanol atau etanol/etantiol adalah sebagai berikut (7).



Gambar 1 Kurva titrasi dari Na-sitrat (A) dengan Na-borat (B)

OPA dan 2-merkaptotanol atau OPA dan ESTH akan bereaksi secara spesifik dan selektif dengan asam amino primer membentuk derivat isoindol yang berfluoresensi yang relatif sangat peka. Karena OPA/2-merkaptotanol (ME) atau OPA/ESTH hanya dapat bereaksi dengan asam amino primer saja, maka asam amino sekunder seperti prolin dan hidroksi prolin harus dioksidasi dahulu menjadi asam amino primer dengan menggunakan asam hipoklorit (HCLO).

Dari gambar 2 terlihat bahwa sekitar 18 macam asam amino dapat terpisah dengan sempurna dengan menggunakan KCKT secara derivatisasi pascakolom, yang pemisahannya didasarkan pada kromatografi penukaran ion. Untuk memisahkan asam amino tersebut hanya diperlukan waktu kira-kira 85 menit, waktu



Gambar 2 Kromatogram yang diperoleh dengan menggunakan alat KCKT secara derivatisasi pascakolom dari 0,25 nmol asam amino

Kondisi pemisahan untuk gambar 2

- Kolom : Amino Acid Analysis colum-TM. Resin penukar kation (SO_3-Na^+)
 Fase gerak : A Dapar sitrat pH = 3,0
 B Dapar borat pH = 9,8

Kondisi elusi gradien

kec. aliran (ml/min)	awal	A (%)	B (%)	kurva
0,4	4	100	0	*
0,4	48	0	100	6
0,4	71	0	100	6
0,4	72	100	0	6

Volume suntikan : 10 μ l
 Detektor : Fluoresensi Model 420
 Emisi : 425 nm
 Eksitasi : 338 nm
 Atenuasi : 4x

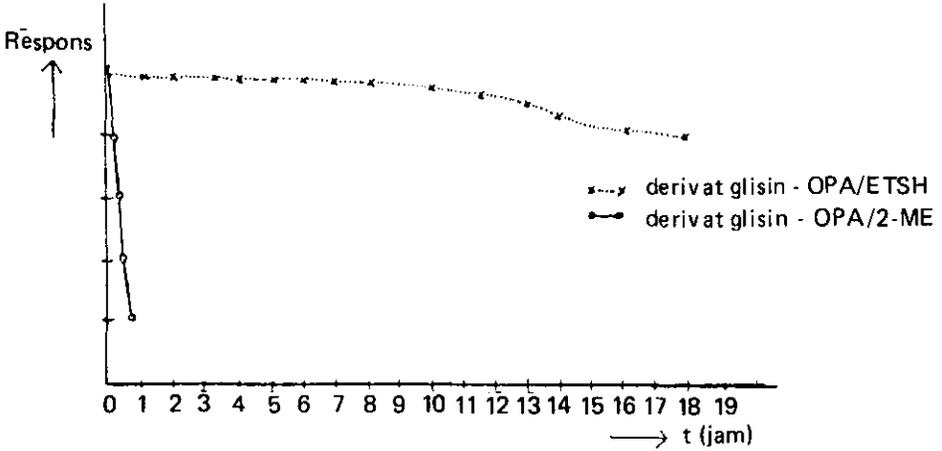
yang relatif singkat dibandingkan dengan metode lain. Di samping itu terlihat bahwa prolin yang merupakan asam amino sekunder dapat terdeteksi. Dengan demikian cara derivatisasi pascakolom dapat digunakan untuk menganalisis asam amino, baik asam amino primer maupun sekunder.

Pada cara derivatisasi prakolom, derivatisasi dilakukan sebelum asam amino tersebut masuk ke dalam kolom, sehingga bentuk isoindolnya yang hidrofil dapat dipisahkan, karena perbedaan derivat dari asam amino tersebut terletak pada bagian nonpolarinya. Karena itu cara yang cocok untuk memisahkannya adalah kromatografi fase balik.

Dalam hal ini mekanisme pemisahannya adalah partisi yang elusinya didasarkan pada kehidrofilan derivat asam aminonya serta pengaturan kepolaran fase geraknya. Derivat asam amino yang bersifat hidrofil akan tertahan lebih lama pada kolom yang bersifat nonpolar, sehingga asam amino yang paling polar akan terelusi paling dahulu. Dengan menggunakan cara ini diperlukan waktu beberapa lama (tergantung pada lamanya pemisahan oleh kolom) dari saat derivatisasi sampai derivat asam amino tersebut dideteksi. Dengan demikian diperlukan zat peraksi yang dapat membentuk derivat asam amino yang stabil dalam selang waktu tersebut.

Dari percobaan diperoleh data seperti terlihat pada gambar 3. Gambar tersebut menunjukkan bahwa derivat asam amino-OPA/ESTH lebih stabil daripada derivat asam amino-OPA/2-ME. Karena itu pereaksi yang dipilih untuk cara derivatisasi prakolom adalah OPA/ESTH.

Di samping itu ternyata derivatisasi prakolom ini hanya digunakan untuk menganalisis asam amino primer, karena OPA/ESTH ataupun OPA/2-ME hanya dapat bereaksi dengan asam amino primer saja. Di sini tidak mungkin dilakukan



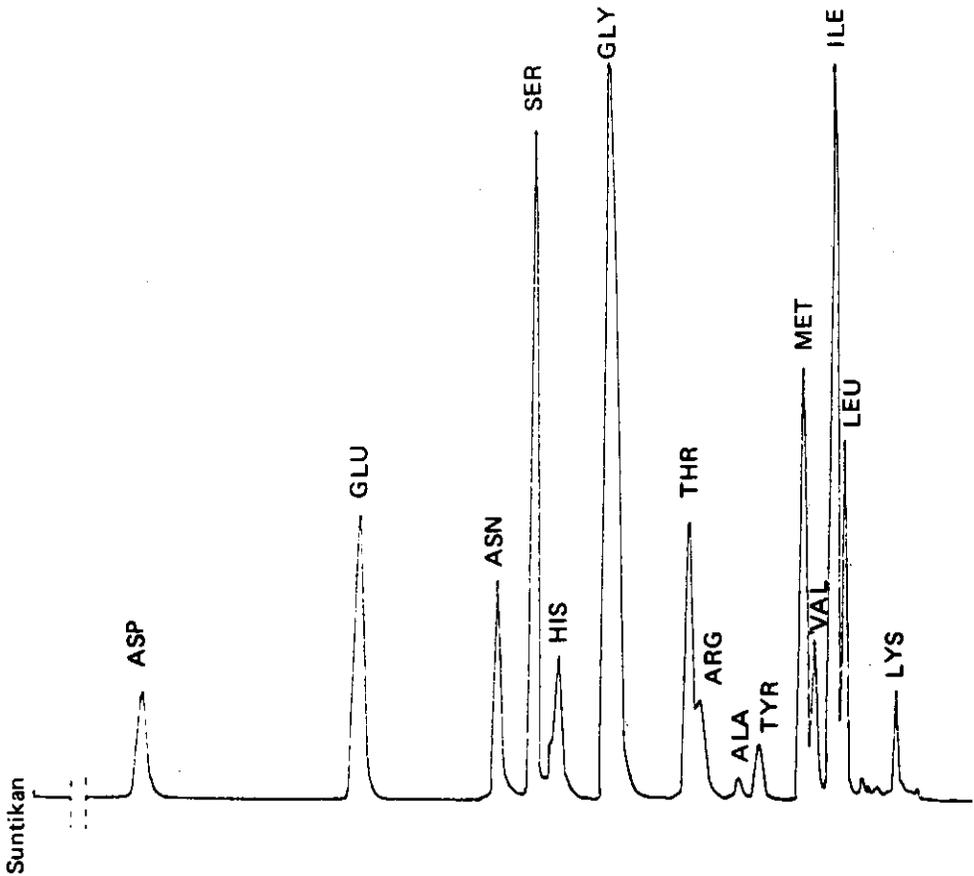
Gambar 3 Kestabilan derivat glisin - OPA/ETSH dan glisin - OPA/2 ME terhadap waktu dengan kondisi kolom : ResolveTM 5 μ C₁₈
 fase gerak : 50 mM Na₃PO₄, pH 7,2/CH₃CN (70/30)
 detektor : Fluoresensi
 eksitasi : 338 nm
 emisi : 425 nm
 vol. suntikan : 10 μ l

oksidasi asam amino sekunder menjadi asam amino primer sebelum melalui kolom. Bila oksidasi ini dilakukan, dapat terjadi kerusakan pada kemasan kolom, yaitu pecahnya ikatan antara fase diam (C18) dengan pendukung padatnya.

Dari data yang terlihat pada gambar 4 ternyata sekitar 17 asam amino dapat terpisah dalam waktu sekitar 30 menit, bahkan seperti terlihat pada gambar 5 hanya 23 menit, dan yang terdeteksi hanya asam amino primer saja.

Dengan kadar asam amino sekitar 50 pmol, respons yang diberikan sudah cukup tinggi. Karena itu cara derivatisasi prakolom ini lebih peka dibandingkan dengan cara derivatisasi pascakolom. Dari hasil percobaan terlihat bahwa salah satu faktor penyebabnya ialah penggunaan HClO dalam cara derivatisasi pascakolom yang ternyata dapat menurunkan kepekaan, karena dapat terbentuk derivat lain yang kekuatan fluoresensinya kurang.

Untuk menganalisis asam amino dalam makanan ternak ternyata harus dilakukan hidrolisis terlebih dahulu dengan HCl 6 N untuk memisahkan asam amino dari proteinnya, sedangkan untuk cuplikan bir dan berem, asam-asam aminonya dapat langsung dianalisis. Pada makanan ternak ditemukan beberapa macam asam amino, antara lain: asam aspartat, treonin, serin, asam glutamat, prolin, glisin, alanin, valin, isoleusin, leusin, fenilalanin, histidin, triptofan, lisin, dan arginin. Prolin dan triptofan dapat dideteksi hanya dengan cara derivatisasi



Gambar 4 Kromatogram yang diperoleh dengan menggunakan alat KCKT secara derivatisasi prakolom dari 50 pmol asam amino baku

Kondisi pemisahan untuk gambar 4

Kolom : Resolve™ 5μ C18

Fase gerak : Kondisi gradien

Pelarut A : MeOH : THF : H₂O = 2 : 2 : 96, yang mengandung 0,05 M Na₂HPO₄ dan 0,05 M Na-asetat; pH diatur sampai 7,5 dengan asam asetat.

Pelarut B : MeOH : H₂O = 65 : 35

Waktu (menit)	Aliran (ml/menit)	% A	% B	Kurva
Awal	0	100	0	•
2,00	0,10	100	0	01
2,50	1,50	100	0	06
14,00	1,50	50	50	07
23,00	1,50	0	100	07
28,00	1,50	100	0	11
35,00	0	100	0	11

Detektor Model 420 AC Fluorecence Detektor, 8*

Catatan :

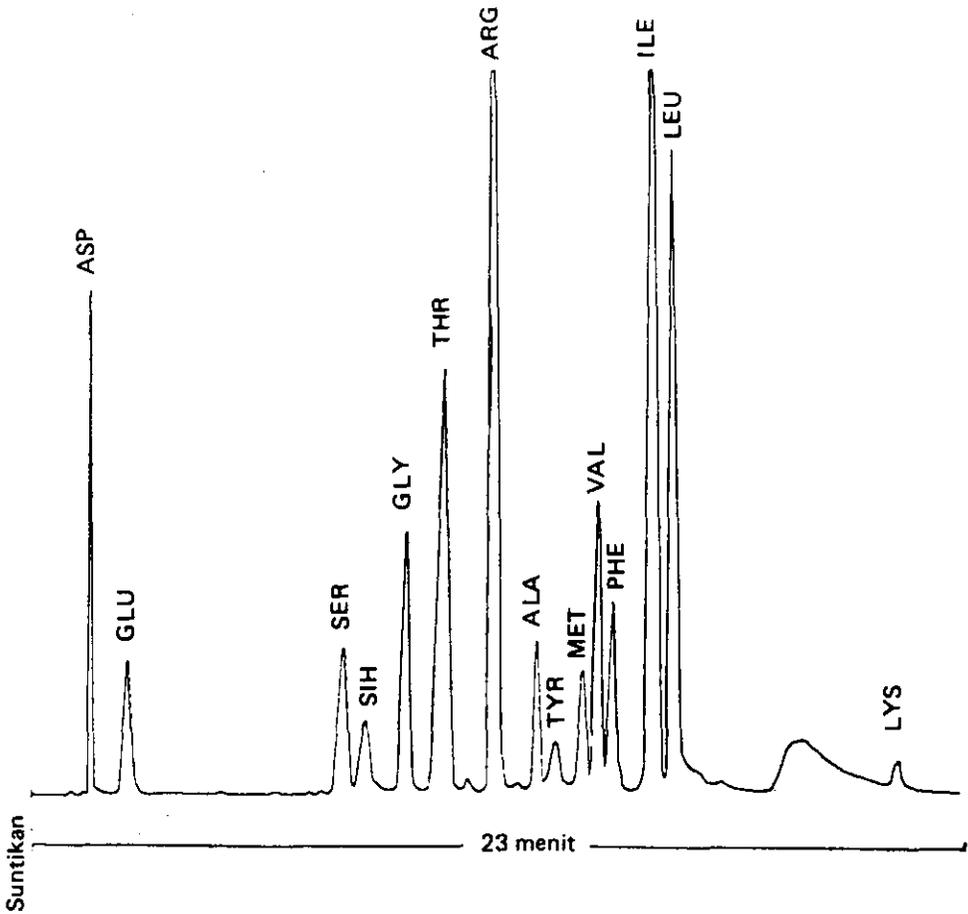
Pada kromatogram dalam gambar 4 tidak ditemukan prolin (asam amino sekunder), karena derivatisasi hanya mungkin terjadi untuk asam amino primer saja. Di samping itu oleh karena di sini tidak digunakan hipoklorit, maka kepekaannya akan lebih tinggi dibandingkan dengan cara derivatisasi pasca kolom.

pascakolom. Pada makanan ternak ini tidak ditemukan asparagin. Hal ini mungkin disebabkan adanya deaminasi pada saat hidrolisis menjadi asam aspartat (7) atau memang proteinnya tidak mengandung asparagin. Dengan menggunakan cara di atas, tanpa melakukan hidrolisis sebelumnya, dalam cuplikan bir ditemukan juga beberapa macam asam amino seperti asam aspartat, asam glutamat, asparagin, serin, histidin, glisin, treonin, arginin, tirosin, metionin, valin, isoleusin, leusin, dan prolin seperti terlihat pada gambar 6 dan 10. Demikian pula pada cuplikan berem dengan menggunakan cara derivatisasi pascakolom, tanpa hidrolisis sebelumnya dapat dideteksi adanya asam amino seperti asam aspartat, treonin, serin, asam glutamat, prolin, glisin, alanin, sistein, valin, metionin, isoleusin, leusin, tirosin, fenil alanin, histidin, dan arginin, seperti terlihat pada gambar 8.

Dalam bir ditemukan asparagin karena tidak dilakukan hidrolisis dengan HCl 6 N sebelum analisis, sehingga asparaginya masih utuh, tidak mengalami deaminasi. Asparagin dan glutamin umumnya ditemukan pada cuplikan asam amino yang diperoleh dengan menghidrolisis protein secara enzimatik (7).

Dalam pemisahan asam amino menggunakan KCKT ini, pengendalian pH dan kepolaran fase gerak mudah dilakukan dengan mengubah perbandingan volume 2 larutan dapar atau fase gerak yang dapat diatur dengan sistem gradien kontinu (bukan gradien bertahap), sehingga tidak mengganggu bentuk kromatogram. Dengan demikian dalam analisis kuantitatif, perhitungan luas puncak kromatogram menjadi lebih teliti. Demikian pula penggunaan pereaksi OPA/2-

ME dan OPA/ESTH menyebabkan metode ini mempunyai kepekaan yang lebih tinggi dan oleh karena reaksinya dengan asam amino spesifik dan selektif, maka metode ini tidak banyak dipengaruhi oleh gangguan matriks.



Gambar 5 Kromatogram yang diperoleh dengan menggunakan alat KCKT secara derivatisasi prakolom dari 50 pmol asam amino baku

Kondisi pemisahan untuk gambar 5

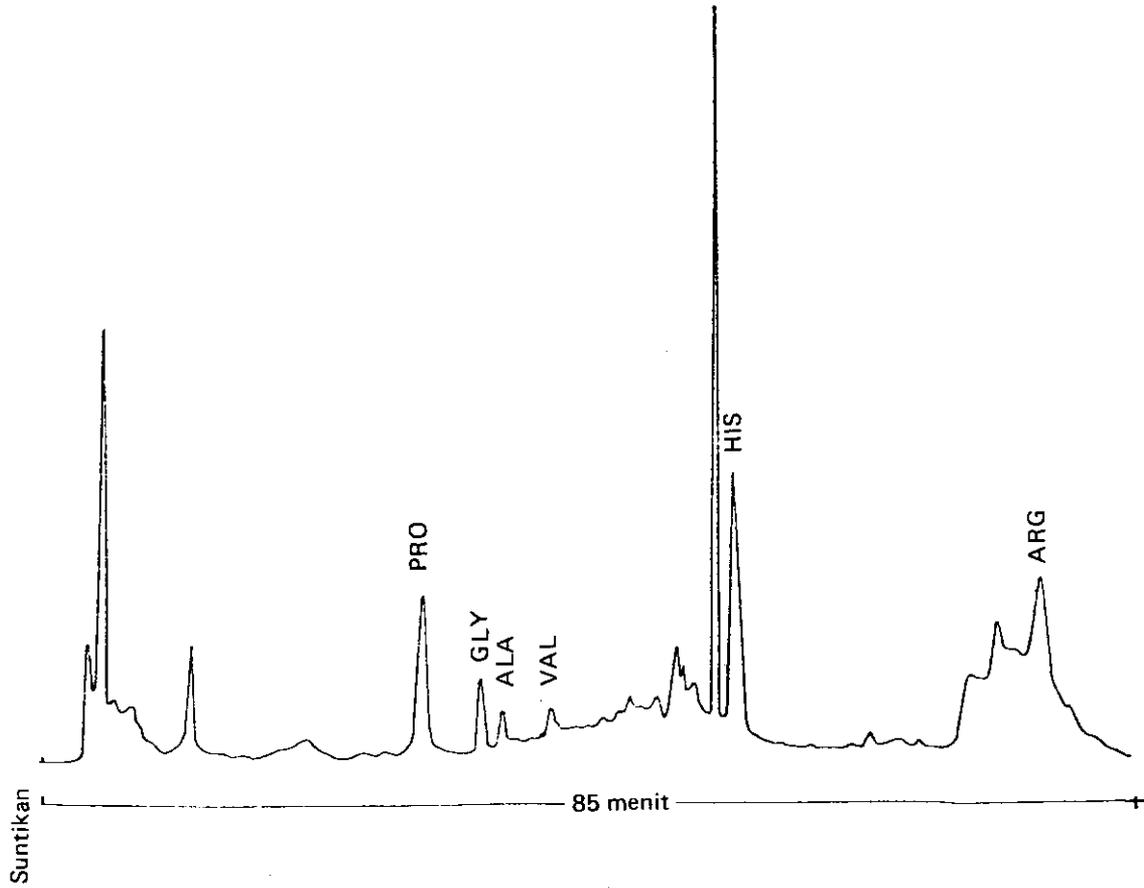
- Kolom : ResolveTM 5 μ C18
- Fase gerak : A : MeOH : THF : H₂O, 2 : 2 : 96, yang mengandung 0,05 M Na₂HPO₄ dan 0,05 M Na-asetat; pH diatur dengan asam asetat sampai 7,5.
- B : MeOH : H₂O, 65 : 35

Kondisi elusi gradien :

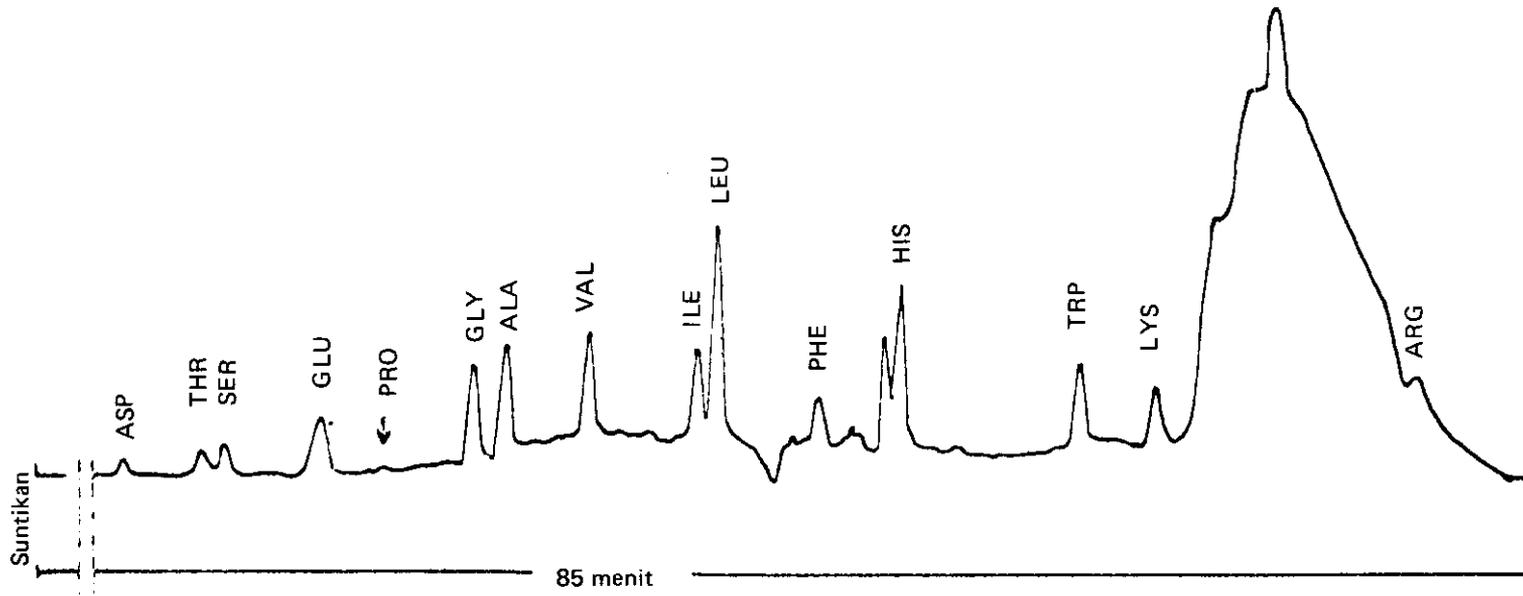
t (menit)	kec. aliran (ml/min)	A (%)	B (%)	kurva
awal	2,00	95	5	*
3	2,00	90	10	6
15	2,00	70	30	6
20	2,00	70	30	6
25	2,00	65	35	6
30	2,00	100	0	6
35	1,00	100	0	6
40	0,50	100	0	6
45	0,10	100	0	6

Volume suntikan : 10 = 1

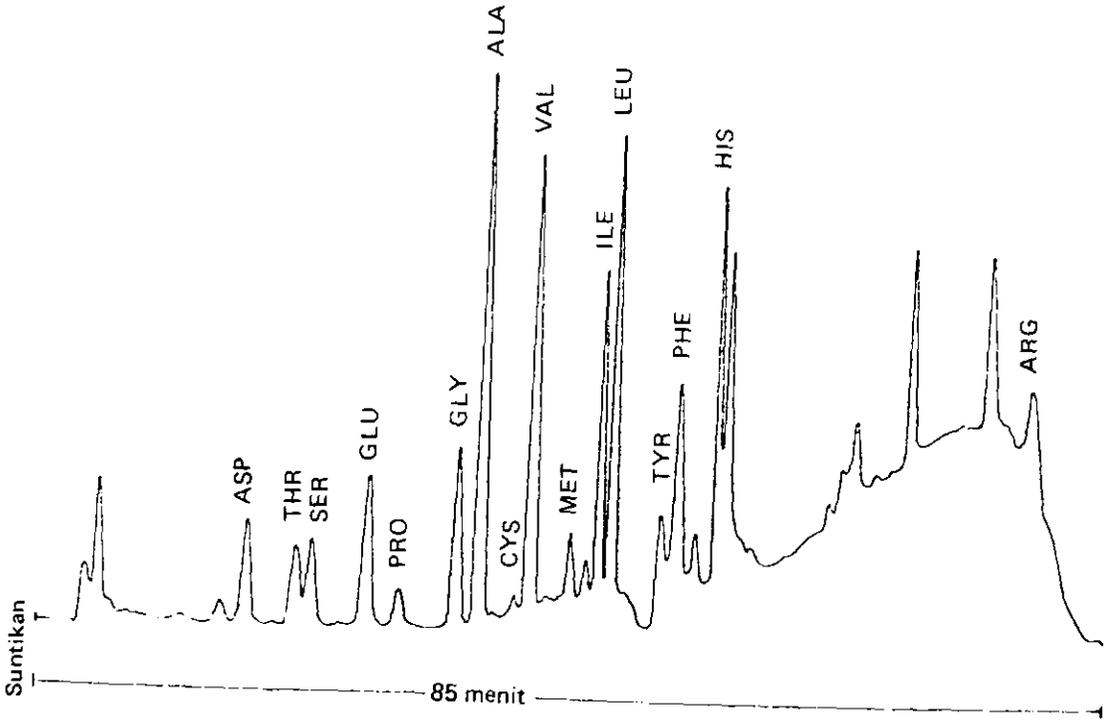
Detektor : Fluoresen' 4x
Emisi, 425 nm
Eksitasi 338 nm



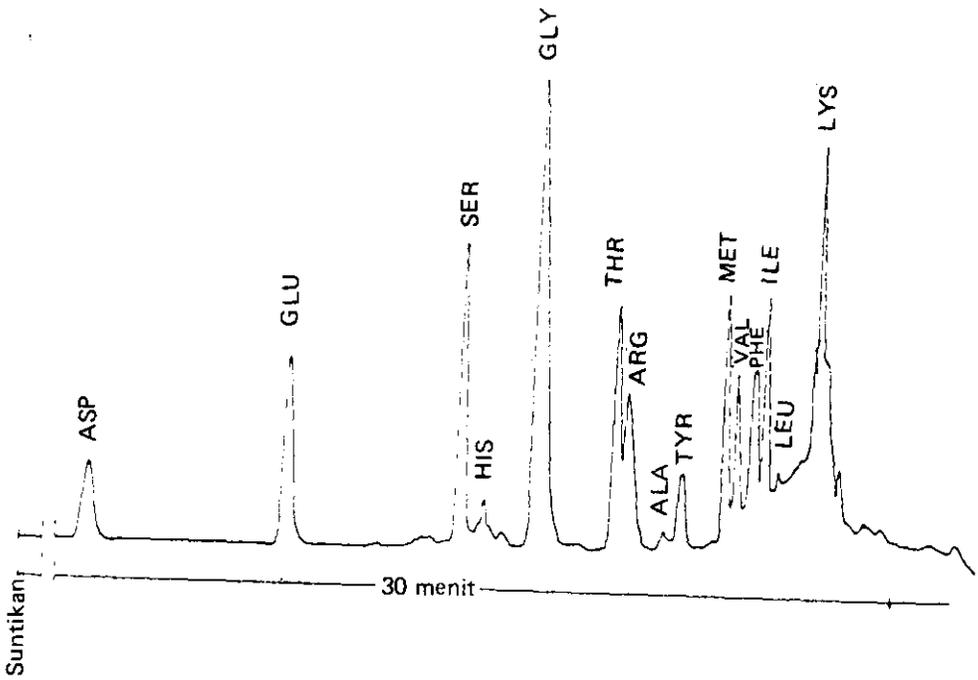
Gambar 6 Kromatogram dari cuplikan bir dengan kondisi yang sama dengan gambar 2 secara derivatisasi pasca kolom



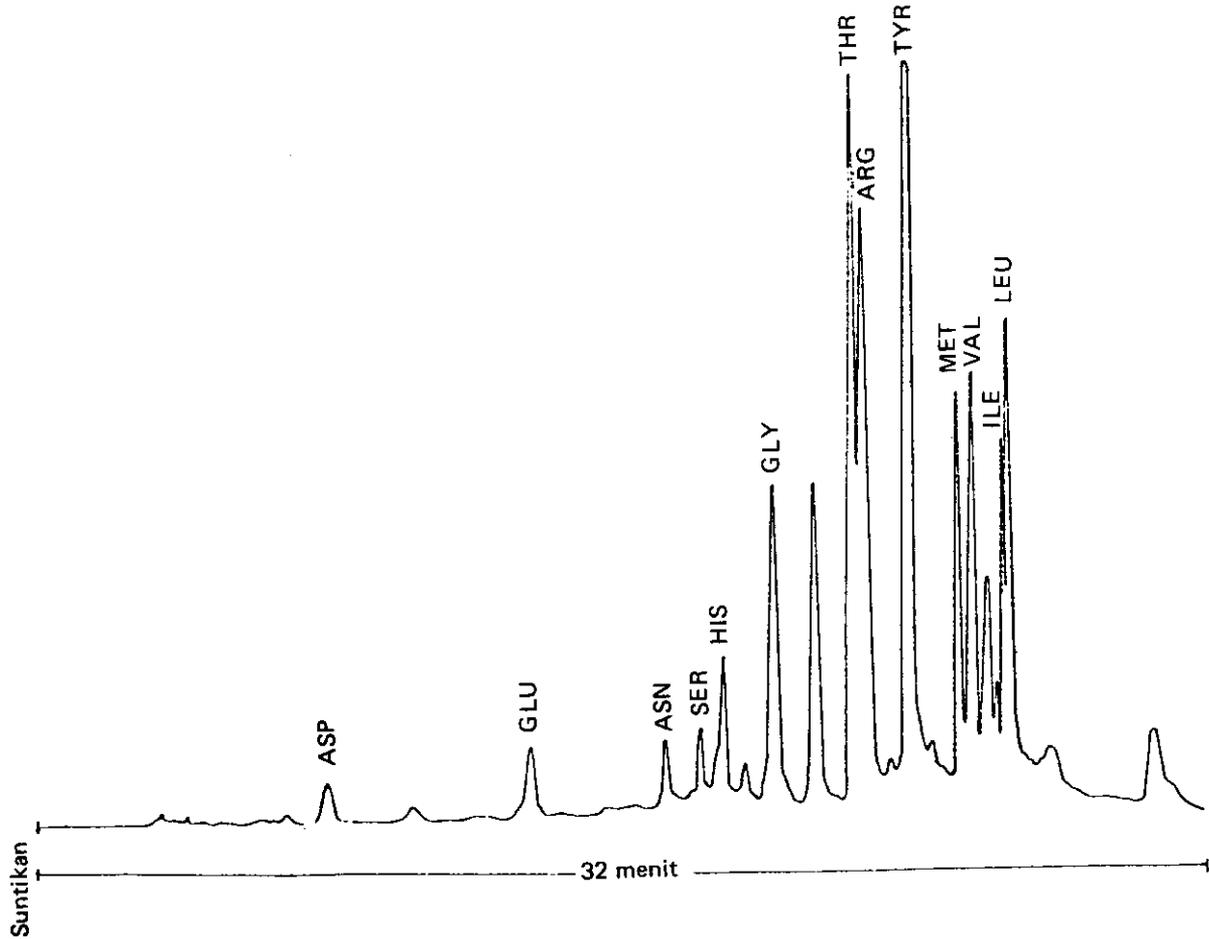
Gambar 7 Kromatogram dari cuplikan makanan ternak dengan kondisi yang sama dengan gambar 2, secara derivatisasi pasca kolom



Gambar 8 Kromatogram dari cuplikan berem dengan menggunakan kondisi KCKT yang sama dengan gambar 2, secara derivatisasi pasca kolom



Gambar 9 Kromatogram dari cuplikan makanan ternak yang diperoleh dengan menggunakan KCKT secara derivatisasi prakolom (kondisi sama dengan gambar 4)



Gambar 10 Kromatogram dari cuplikan bir yang diperoleh dengan menggunakan KCKT secara derivatisasi prakolom (kondisi sama dengan gambar 4)

KESIMPULAN

Analisis asam amino dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan menggunakan o-ftalaldehida/etantiol sebagai zat penderivasasi, mempunyai beberapa keunggulan, yaitu: daya pisahnya tinggi karena menggunakan kolom yang sangat efisien, serta ditunjang oleh penggunaan peralatan yang baik; kepekaan tinggi, sehingga dapat digunakan untuk menganalisis asam-asam amino dengan kadar yang rendah; waktu analisisnya singkat, serta tidak banyak dipengaruhi oleh matriks; pengendalian pH dan kepolaran fase gerak mudah diatur dengan menggunakan sistem gradien kontinu.

Derivatisasi asam amino dapat dilakukan dengan cara derivatisasi pascakolom dan derivatisasi prakolom.

Cara derivatisasi pascakolom dapat digunakan untuk menganalisis asam amino primer maupun asam amino sekunder, sedangkan derivatisasi prakolom hanya dapat digunakan untuk menganalisis asam amino primer saja. Akan tetapi saat ini cara derivatisasi pascakolom memerlukan waktu pemisahan yang lebih lama dan kepekaannya relatif lebih rendah dibandingkan cara derivatisasi prakolom.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, *et al.*, *Remington's pharmaceuticals science*, 15th ed, 1975.
- Amino Acid Analysis System, Operator's Manual, Waters, The Liquid Chromatography people.
- Amino Acid Analysis, Liquid Chromatography Column, Care and Use Manual, Waters, The Liquid Chromatography People, Millipore.
- Hill D., L. Burnworth, W. Shea and R. Preifer, Quantitative HPLC Analysis of Plasma Amino Acids as o-Phtalaldehyde/ethanthiol Derivatives, *J. Liq. Chromatog.*, 5(12), 2369-93 (1982).
- Hill D., *et al.*, High Performance Liquid Chromatography Determination of Amino Acids in the Picomole Range, *Anal. Chem.*, 51, 1338 (1979).
- Pfeifer R., *et al.*, Practical Application of HPLC to Amino Acid Analysis, *American Laboratory*, March, 1983.
- Spackman D. H., W. H. Stein, and S. Moore, *Anal. Chem.*, 30, 1190, 1958.
- Wheler G. H. T. and J. T. Russel, Separation and Quantitation of o-Phtalaldehyde Derivatives of Taurine and Related Compound in a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) System, *J. Liq. Chromatog.*, 4(7), 1281-1291 (1981).