

KARAKTERISASI PUNCAK KROMATOGRAM DALAM HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) TERHADAP PERBEDAAN FASE GERAK, LAJU ALIR, DAN PENAMBAHAN ASAM DALAM ANALISIS INDOLE ACETIC ACID (IAA)
(CHARACTERIZATION OF PEAK CHROMATOGRAM IN HPLC INFLUENCED BY DIFFERENCES OF MOBILE PHASE, FLOW RATE, AND ADDITION OF ACID IN ANALYSIS OF INDOLE ACETIC ACID (IAA))

Rosydiati¹, Ela Kamelia Saleh².

^{1,2}Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH), Institut Teknologi Bandung
E-mail: rosydiati@sith.itb.ac.id

ABSTRACT

HPLC is a chromatographic technique for liquids accompanied by high pressure. In the operational process, a problem is found, namely the results of the separation of a sample resulting in a tangent peak, long retention time, and difficult to get optimal conditions so that the mobile phase becomes wasteful. The success of measurement by HPLC is influenced by the operational conditions of the tool and the mobile phase used, which is done by adjusting the ratio of the mobile phase, changes in flow rate, pH of the mobile phase, and temperature. This research was carried out by testing the standard IAA compounds and extracting samples under mobile phase conditions with a ratio of methanol: water (5: 5, 6: 4, 7: 3, 8: 2, 9: 1, 10: 0). In addition, addition of 0.1% phosphoric acid was carried out and optimization of the flow rate was carried out. The optimum conditions were achieved at a mobile phase ratio of methanol: 0.1% phosphate (5: 5) with a flow rate of 0.8 ml / min in which a complete separation was formed. This refers to the sample 'k value of 2.9, resolution value of 1,499, Tf value of 1,592, retention time of 8.6. The results of this experiment are expected to be used as a material consideration for operators or HPLC technicians in analyzing IAA or other compounds as well as taking steps to solve the problems associated with peaks in chromatograms so that operators can save time in analysis and extend column life

Key words: mobile phase, Flow rate, HPLC, IAA, peak of chromatogram

ABSTRAK

HPLC merupakan salah satu teknik kromatografi untuk zat cair yang disertai dengan tekanan tinggi. Dalam proses operasionalnya ditemukan permasalahan yaitu hasil pemisahan dari suatu sampel menghasilkan puncak yang bersinggungan, waktu retensi yang lama, dan sulit mendapatkan kondisi optimal sehingga fase gerak menjadi boros. Keberhasilan pengukuran dengan HPLC dipengaruhi oleh kondisi operasional dari alat dan fase gerak yang digunakan yaitu diantaranya dilakukan dengan cara mengatur perbandingan fase gerak, perubahan laju alir, pH fase gerak, dan temperatur. Penelitian ini dilakukan dengan menguji senyawa standar IAA dan ekstrak sampel pada kondisi fase gerak dengan perbandingan metanol : air (5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, 10:0). Selain itu dilakukan penambahan asam fosfat 0,1% dan optimasi pada laju alir. Kondisi optimum dicapai pada perbandingan fase gerak metanol : 0.1% fosfat (5:5) dengan laju alir 0.8 ml/menit dimana terbentuk pemisahan yang sempurna. Hal ini mengacu pada nilai k' sampel yaitu 2,9, nilai resolusi 1.499, nilai Tf 1.592, waktu retensi 8.6. Hasil percobaan ini diharapkan dapat digunakan sebagai salah satu bahan pertimbangan bagi operator atau teknisi HPLC dalam melakukan analisis IAA atau senyawa lainnya serta mengambil langkah penyelesaian apabila menemukan permasalahan terkait puncak dalam kromatogram sehingga operator dapat menghemat waktu dalam analisis dan memperpanjang usia kolom.

Kata kunci: Fase gerak, HPLC, IAA, Laju Alir, Puncak Kromatogram

PENDAHULUAN

IAA adalah fitohormon auksin yang banyak terdapat di alam dan paling aktif (Tsavkelova dkk, 2005) dan merupakan auksin utama pada tanaman yang terdapat pada

hampir semua jenis tanaman (Leveau dan indow, 2005). IAA termasuk fitohormon golongan auksin alami dan berperan sebagai zat pemacu dalam meningkatkan sintesis DNA dan RNA, serta pemanjangan sel dengan

meningkatnya pertukaran proton (Aslamsyah, 2002). Fitohormon auksin alami jenis IAA bersifat sangat labil dan mudah terdegradasi secara enzimatis karena pengaruh aktivitas peroksidase pada tanaman. Selain itu, IAA juga mudah terdegradasi secara non-enzimatis akibat pengaruh intensitas cahaya dan temperatur yang tinggi. Oleh karena itu, larutan stok IAA sebaiknya disimpan pada botol berwarna coklat/gelap agar terlindung dari intensitas cahaya yang tinggi dan ditempatkan dalam pendingin dengan suhu 2 - 6°C (Dascaliuc, 2002). IAA adalah hormon yang seringkali digunakan dalam laboratorium kimia analisis bahan alam sebagai zat pengatur tumbuh baik dalam medium kultur jaringan maupun dalam media tanam tumbuhan. Penambahan IAA ini digunakan untuk mengetahui reaksi pertumbuhan atau perkembangan tanaman yang diberikan perlakuan tertentu.

HPLC adalah pengembangan terkini dari kromatografi cair kolom klasik pada kolom, detektor yang lebih sensitif dan peka serta kemajuan teknologi pada pompa bertekanan tinggi yang menyebabkan HPLC menjadi suatu metode dengan sistem pemisahan zat yang cepat dan efisien (Johnson, 1991). Analisis senyawa kuantitatif dengan HPLC seringkali digunakan di Laboratorium Isolasi dan Analisis Bahan Alam. Analisis dengan HPLC memiliki beberapa keunggulan antara lain waktu analisis relatif singkat, volume sampel yang digunakan sedikit, dapat menganalisis senyawa organik dan anorganik, serta kolom yang dapat digunakan kembali (Ardianingsih, 2009).

Analisis dikatakan baik jika waktu analisisnya singkat dan daya pisahnya tinggi (Gritter, et. al., 1991). Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil pemisahan antara lain, pengaturan komposisi fase gerak, laju alir serta ada tidaknya penambahan asam (Amin, dkk., 2016). Pada analisis HPLC, seringkali ditemukan beberapa permasalahan diantaranya puncak yang tidak terpisah sempurna pada sampel, terjadi pelebaran puncak kromatogram, serta sulit mencari kondisi operasi yang optimum sehingga waktu analisis menjadi lama dan penggunaan fase gerak lebih boros. Permasalahan inilah yang melatarbelakangi penulis untuk mengetahui pengaruh kondisi operasional alat dan fase gerak terhadap puncak yang dihasilkan yaitu dengan melakukan optimasi terhadap perbedaan komposisi fase gerak, laju alir, waktu retensi dan pH fase gerak dan pengaruhnya terhadap tekanan kolom. Penelitian dilakukan dengan menggunakan senyawa standar murni IAA (*Indole-3-acetic acid*) dan ekstrak sampel. Hal ini penting untuk dilakukan agar diperoleh puncak kromatogram yang sempurna dan hasil pemisahan yang baik. Karakterisasi analisis IAA dengan HPLC dilakukan karena hormon ini sering dianalisis di laboratorium kami baik sebagai perlakuan penambahan IAA pada tanaman maupun kadar IAA dalam tanaman.

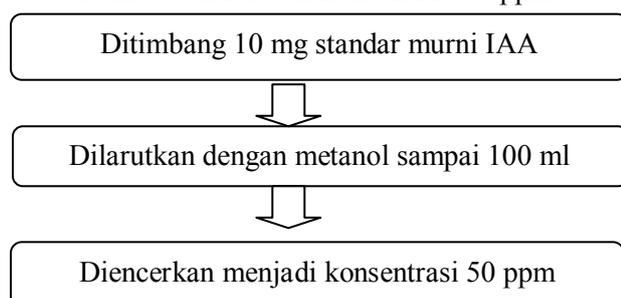
Makalah ini mengusulkan mengenai cara kerja alat dengan menggunakan berbagai kondisi eluen, Selanjutnya pada bagian metode membahas mengenai tahapan-tahapan pekerjaan yang dilakukan untuk mengetahui berbagai pengaruh kondisi operasi terhadap karakteristik kromatogram. Pada bagian hasil

dan pembahasan dipaparkan hasil percobaan pengaruh komposisi fase gerak, penambahan asam dan perbedaan laju alir terhadap karakteristik kromatogram yang disajikan dalam grafik, tabel dan gambar. Pada bagian pembahasan juga dijelaskan mengenai bagaimana pH fase gerak dapat secara signifikan mempengaruhi profil kromatogram. Hasil percobaan dihubungkan dengan teori terkait syarat kromatogram yang baik dalam analisis HPLC sehingga di bagian kesimpulan dapat diperoleh kondisi optimum yang terbaik dalam analisis IAA atau senyawa sejenis lainnya yang dapat menghasilkan puncak yang terpisah dan bentuk kromatogram yang sempurna.

METODE

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kondisi operasi yang optimum dalam analisis senyawa IAA dengan HPLC. Berbagai faktor yang mempengaruhi hasil analisis seperti komposisi fase gerak, perbedaan laju alir dan penambahan asam dicoba satu per satu. Analisis dijalankan menggunakan HPLC fase terbalik, merk Shimadzu, kolom C18 (Shimpack VP-ODS 4.6 mm x 250 mm). Tahapan-tahapan percobaan pada penelitian ini yaitu sebagai berikut :

- Pembuatan Larutan Baku IAA 100 ppm



- Percobaan Pengaruh Komposisi Fase Gerak Sebanyak 20 µl larutan standar IAA dengan konsentrasi 50 ppm serta larutan sampel diinjeksikan ke dalam HPLC. Fase gerak yang digunakan adalah metanol : aquabidest dengan berbagai perbandingan (5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1). Nilai tekanan dicatat pada tiap kondisi operasi dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.
- Percobaan Pengaruh Penambahan Asam Larutan asam yang digunakan pada penelitian ini adalah larutan 0,1% asam posfat yang dibuat dengan cara mengencerkan dari larutan stok asam posfat 85%. Sebanyak 20 µl larutan standar IAA dengan konsentrasi 50 ppm serta larutan sampel diinjeksikan ke dalam HPLC. Fase gerak yang digunakan adalah metanol : 0.1% asam posfat dengan berbagai perbandingan (5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1). Nilai tekanan dicatat pada tiap kondisi operasi dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.
- Percobaan Pengaruh Penentuan Laju Alir Komposisi fase gerak yang optimum digunakan pada tahap ini. Kondisi operasi dijalankan dengan laju alir yang berbeda yaitu 0.5 ml/menit, 0.8 ml/menit dan 1 ml/menit. Standar IAA dan sampel diinjeksikan ke dalam HPLC. Nilai tekanan dicatat pada tiap kondisi operasi dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

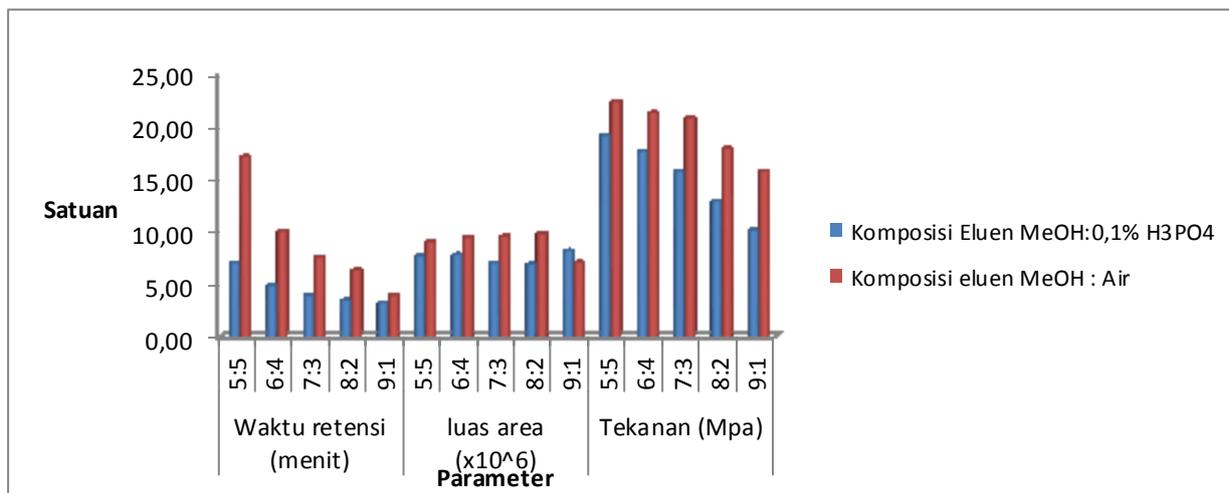
Nilai tekanan selalu dicatat pada tiap percobaan untuk melihat pengaruh komposisi fase gerak, perbedaan laju alir dan penambahan asam pada tekanan yang dihasilkan untuk menjaga kualitas kolom.

Fokus kami sebagai teknisi/operator HPLC adalah selain mampu menghasilkan kromatogram yang baik dalam tiap analisis sampel, juga harus mampu memelihara kondisi alat agar tetap dalam kondisi prima, salah satunya dengan menjaga tekanan agar kolom tidak cepat rusak sehingga dapat memperpanjang masa pakainya.

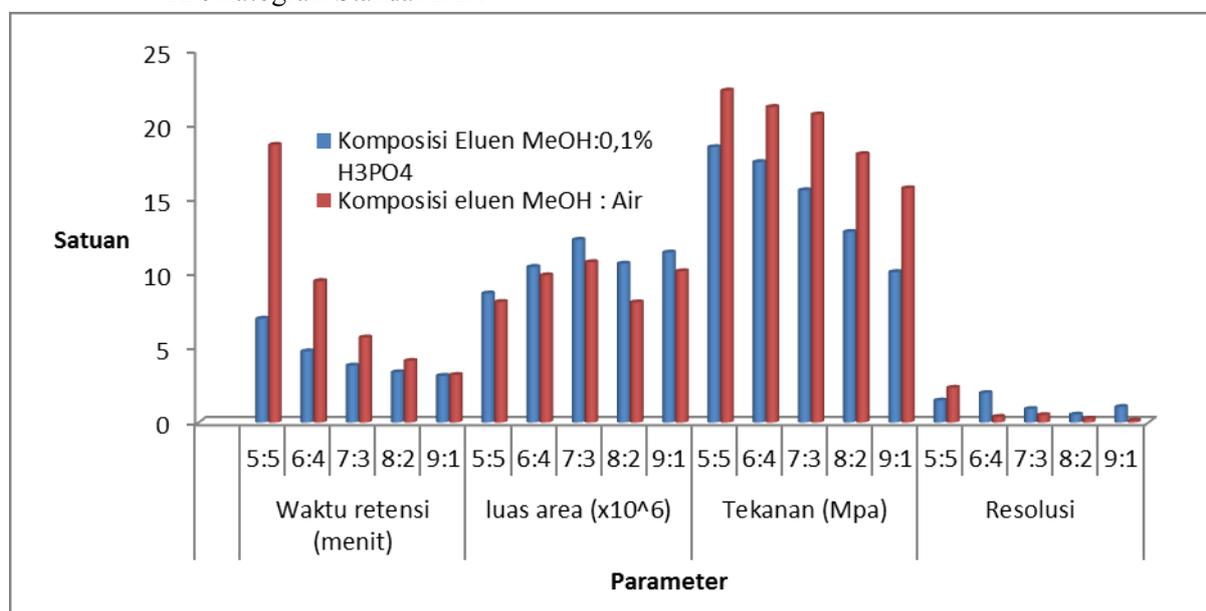
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia (analit) yang berdasarkan pada perbedaan migrasi/distribusi masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam (*stationary phase*) dibawah pengaruh fase gerak (*mobile phase*), fase gerak dapat berupa gas atau zat cair dan fasa diam dapat berupa zat cair atau zat padat (Susanti dan Dachriyanus, 2002). Kromatografi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi partisi fase terbalik yaitu fase diam senyawa non polar dan fase gerak senyawa yang lebih polar (Susanti dan Dachriyanus, 2002). Fase gerak yang digunakan adalah campuran metanol dan air, selain itu diujicoba juga dengan penambahan asam. Metanol dipilih sebagai salah satu campuran fase gerak karena IAA memiliki kelarutan yang baik dalam metanol. Fungsi fase gerak adalah melarutkan campuran zat, mengangkat atau membawa komponen yang akan dipisahkan melewati sorben fase diam sehingga memiliki waktu retensi dalam rentang yang dipersyaratkan, memberikan selektifitas yang memadai untuk campuran senyawa yang akan dipisahkan (Wulandari, 2011).

Pemisahan yang baik dalam HPLC diantaranya dipengaruhi oleh pengaturan komposisi fase gerak dan pH fase gerak. Berdasarkan Gambar 1, komposisi fase gerak dari perbandingan metanol : air atau asam posfat (5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1) menunjukkan bahwa semakin banyak metanol yang digunakan maka waktu retensi dan tekanan semakin rendah. Penurunan ini disebabkan karena IAA memiliki kelarutan yang baik terhadap metanol sehingga IAA berinteraksi kuat dengan metanol dan memiliki interaksi yang rendah dengan air atau asam posfat dan fase diam. Fase gerak yang menggunakan metanol : asam posfat memiliki waktu retensi dan tekanan yang lebih rendah dan luas area yang lebih stabil dibandingkan menggunakan metanol : air di setiap perbandingan komposisi. Perbedaan ini disebabkan karena nilai tetapan disosiasi ($pK_{a1}=2.148$) dari asam posfat dibawah dari pK_a IAA (4.66) maka IAA akan berbentuk molekul sehingga afinitas IAA terhadap fase diam dan fase gerak akan sesuai dengan nilai koefisien partisinya sedangkan jika menggunakan air maka pK_a IAA dibawah pK_a air (7) maka IAA cenderung berbentuk ion yang bersifat polar sehingga cenderung terlarut terhadap air yang menyebabkan waktu retensi dan tekanan lebih besar (Wulandari, 2011). Konsep interaksinya yaitu bagian non polar dari IAA akan berinteraksi dengan kolom melalui ikatan Van der Waals, sedangkan bagian polar dari IAA berinteraksi dengan fase gerak melalui ikatan hidrogen dan ikatan ionik. Interaksi hidrogen dan ionik antara IAA dan fase gerak lebih kuat sehingga IAA terelusi keluar dari kolom (Putri, 2011).



Gambar 1 Grafik Pengaruh Komposisi Fase Gerak dan Penambahan Asam Terhadap Peak Kromatografi Standar IAA

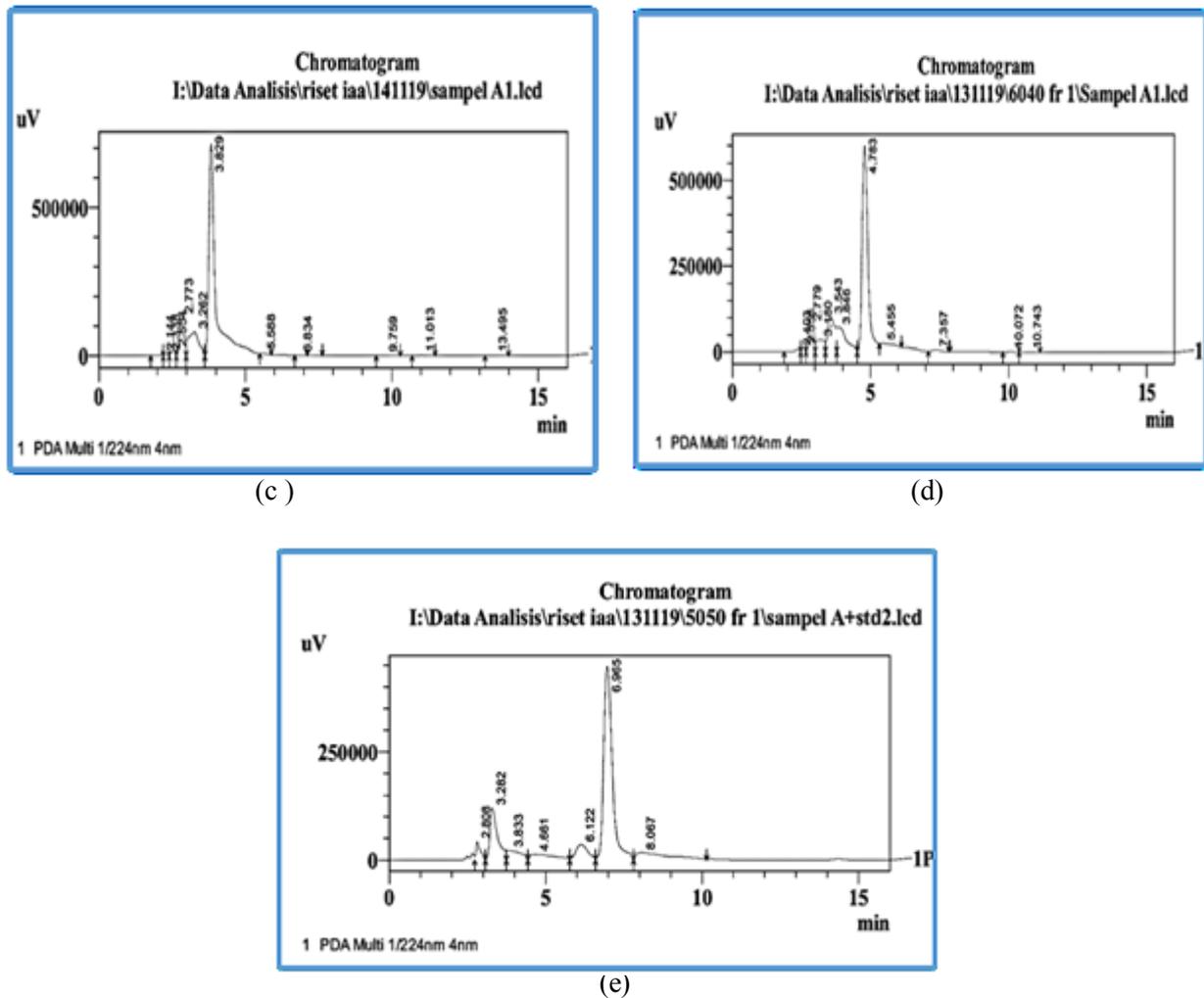


Gambar 2 Grafik Pengaruh Komposisi Fase Gerak dan Penambahan Asam Terhadap Peak Kromatografi Sampel

Berdasarkan Gambar 2, Komposisi fase gerak menggunakan asam posfat memiliki waktu retensi kurang dari 10 menit, resolusi lebih besar dibandingkan menggunakan air. Menurut Centre for Drug Evaluation and Research (1994), syarat kromatogram yang baik, antara lain memiliki Bentuk peak : simetri, Waktu retensi : < 10 menit dan Resolusi : ≥ 1.5 . Hasil percobaan menunjukkan bahwa analisis IAA pemisahannya lebih baik

menggunakan asam yang ditunjukkan kromatogram nya pada Gambar 3.

Berdasarkan Gambar 3 dan Gambar 4, kondisi operasi yang optimal untuk analisis senyawa IAA mampu dicapai pada perbandingan metanol : 0.1% asam posfat (50:50). Hal ini dapat dilihat dari nilai *tailing factor* yang paling kecil, nilai k mendekati 2 dan nilai resolusi 1.472 serta waktu retensi kurang dari 10 menit (pemisahan dapat



Gambar 4. Kromatogram komposisi metanol: asam posfat (a) 9:1 (b) 8:2 (c) 7:3 (d) 6:4 (e) 5 :5 Penelitian mengenai pengaruh perbedaan laju alir dilakukan pada kondisi operasi yang optimal yaitu menggunakan fase gerak metanol : 0.1% asam posfat (50:50). Analisis dijalankan pada laju alir 1 ml/menit, 0.8 ml/menit dan 0.5 ml/menit. Hasil percobaan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Perbedaan Laju Alir pada Karakteristik Kromatogram Senyawa IAA

Laju Alir	Standar dan Sampel	Rata-rata Waktu Retensi	Rata-rata Luas Area	Rata-rata <i>Tailing Factor</i>	Rata-rata Tekanan (MPa)	Rata-rata k'	Rata-rata Resolusi
1 ml / menit	Standar	6.926	7577539	1.523	19.0	-	-
	Sampel	6.967	8667543	1.595	18.5	1.972	1.472
0.8 ml/menit	Standar	8.666	9057749	1.592	15.3	1.463	1.738
	Sampel	8.665	9399780	1.685	15.3	2.906	1.499
0.5 ml/menit	Standar	13.802	13931157	-	-	-	-
	Sampel	13.778	13212972	-	11.0	2.062	1.496

Berdasarkan data pada tabel 1, secara umum, pada kondisi laju alir 1 ml/menit sudah memberikan hasil kromatogram yang baik dan

puncak-puncak kromatogram yang sudah terpisah. Akan tetapi bila dilihat dari nilai tekanan sebesar 19 Mpa, nilainya mendekati

nilai tekanan maksimum yang disarankan pada sertifikat kolom alat yaitu sebesar 20 Mpa. Pada kondisi laju alir 0.8 ml/menit, selain memberikan nilai k dan resolusi yang lebih besar daripada laju alir 1 ml/menit, nilai tekanannya juga tidak terlalu tinggi, yaitu sebesar 15 Mpa. Menjaga tekanan pompa sangat penting agar kolom tidak cepat rusak. Waktu retensi senyawa juga masih dalam rentang yang disarankan yaitu kurang dari 10 menit. Sedangkan, pada laju alir 0.5 ml/menit, bagian bawah peak sudah agak melebar ditandai dengan nilai *tailing factor* yang tidak lagi bisa dideteksi serta waktu retensi senyawa yang cukup lama sehingga pemisahan tidak efektif dan penggunaan fase gerak menjadi boros. Dengan demikian kondisi operasi yang optimal pada analisis senyawa IAA yang dapat menghasilkan puncak kromatogram yang baik adalah pada penggunaan fase gerak metanol : 0.1% asam posfat (50:50), laju alir 0.8 ml/menit dan panjang gelombang 224 nm.

SIMPULAN

Perbedaan komposisi fase gerak, laju alir dan ada tidaknya penambahan asam sangat mempengaruhi profil/karakteristik kromatogram yang dihasilkan pada analisis HPLC. Penambahan asam pada fase gerak akan mempertajam bentuk *peak*, meningkatkan selektifitas, memperkecil nilai *tailing* dan dapat menurunkan tekanan pompa. Penurunan laju alir dapat memperbesar nilai resolusi namun memperlambat waktu elusi. Kondisi operasi yang optimal untuk analisis senyawa IAA yaitu pada perbandingan metanol : 0.1% H₃PO₄ (5:5), laju alir 0.8 ml/menit, panjang

gelombang 224 nm. Kondisi ini menghasilkan puncak kromatogram yang runcing, simetri, nilai *tailing* <2, waktu retensi 8.6 menit (di bawah 10 menit), nilai k 2.9 dan nilai resolusi 1.499.

Hasil percobaan ini dapat menjadi acuan bagi operator HPLC dalam menentukan kondisi operasi yang optimal pada analisis senyawa IAA untuk menghasilkan puncak yang baik, sehingga dapat menghemat waktu analisis dan penggunaan fase gerak karena tidak perlu melakukan berbagai optimasi, dapat memperpanjang umur kolom karena mengetahui *range* tekanan yang dihasilkan pada berbagai kondisi operasi, serta menjadi bahan pertimbangan dalam menyelesaikan permasalahan terkait kromatogram dalam analisis HPLC.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami ucapkan terima kasih kepada orangtua kami, suami, dan anak-anak serta kepada Institut Teknologi Bandung atas bantuan dana penelitiannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, S., Amir, M., dan Slamet, I. 2016. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Untuk Analisis Senyawa Diuretik Yang Disalahgunakan Sebagai Doping Dalam Urin. Jurnal Sains Keolahragaan & Kesehatan. Volume I, No. 2.
- Ardianingsih, R. 2009. Penggunaan High Performance Liquid Chromatographi (HPLC) Dalam Proses Analisa Deteksi Ion. LAPAN. Berita Dirgantara volume 10 :101-104.
- Aslamsyah, S. 2002. Peranan Hormon Tumbuh dalam Memacu Pertumbuhan Alga. [Http://tumoutou.net/702_05123/SitiAslamsyah.htm](http://tumoutou.net/702_05123/SitiAslamsyah.htm) (15 Juli 2009).

- Dascaliuc. 2002. Hormones and Synthetic Plant Growth Regulators in Agriculture. Institute of Genetics and Plant Physiology, Academy of Sciences of Moldova, 20 Padurii str., Chisinau, Moldova.
- Gritter, R. J., Bobbit, J. M., Schwarting, A.M. 1991. *Introduction to Chromatography*. Penerjemah : Kosasih Padmawinata. Bandung : ITB.
- Leveau, J.H.J. and S.E. Lindow. 2005. Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.71, 2365-2371.
- Putri, A.E.S. 2011. Optimasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Fase Terbalik pada Penetapan Kadar Nikotin dalam Ekstrak Etanolik Daun Tembakau. *Skripsi*. Fakultas Ilmu Farmasi. Yogyakarta : Universitas Sanata Dharma.
- Susanti, M. Dan Dachriyanusus. 2002. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Padang : LPTIK Universitas Andalas.
- Tsavkelova, E.A., T.A. Cherdyntseva, and A.I. Netrusov. 2005. Auxin Production by Bacteria Associated with Orchid Roots. *Microbiology*, Vol. 74, No. 1, pp. 46-53.
- Wulandari, L. 2011. Kromatografi Lapis Tipis. Jember : Taman Kampus Presindo.