

PEMISAHAN DERIVAT ASAM AMINO – PITC PADA PAKAN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Fahma Riyanti
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRAK

Kandungan asam amino yang dapat ditentukan pada pakan dengan kromatografi cair tekanan tinggi (KCKT), menggunakan kolom Pico-Tag C₁₈ berjumlah 17 jenis asam amino. Deteksi komponen dilakukan dengan detektor UV pada panjang gelombang 254 nm. Limit deteksi minimum yang diperoleh relatif kecil yaitu 2,058 ng dan kurva kalibrasi yang didapat untuk setiap derivat asam amino merupakan garis lurus dengan koefisien korelasi mendekati 1. Penentuan sistin dan metionin dilakukan dalam bentuk asam sisteat dan metionin sulfon

PENDAHULUAN

Untuk mendukung keberhasilan usaha peningkatan jumlah dan mutu ternak maka peranan pakan merupakan faktor yang penting sekali. Pakan yang bermutu selain harus mengandung unsur-unsur gizi seperti karbohidrat, lemak, vitamin, dan mineral juga harus mengandung protein dalam jumlah yang cukup.

Mutu protein dinilai dari perbandingan asam-asam amino yang terkandung dalam protein tersebut. Pada prinsipnya suatu protein dikatakan mempunyai mutu yang tinggi apabila dapat menyediakan asam-asam amino esensial. Sebaliknya protein yang

kekurangan satu atau lebih asam-asam amino esensial mempunyai mutu yang rendah. Jumlah asam amino yang tidak esensial tidak dapat digunakan sebagai pedoman, karena asam-asam amino tersebut dapat disintesis di dalam tubuh. Protein yang berasal dari hewani seperti daging, telur, ikan, dan susu dapat menyediakan asam-asam amino esensial.

Untuk mengetahui kualitas pakan, maka perlu dilakukan analisa kandungan asam-asam amino yang terdapat di dalam protein sehingga mutu protein diketahui. Berdasarkan hal tersebut, metode KCKT fasa terbalik merupakan pilihan yang tepat karena metoda tersebut dapat mencakup metoda

pemisahan dan penentuannya baik secara kualitatif maupun kuantitatif.

Sebelum contoh dianalisa dengan metoda KCKT fasa terbalik, protein perlu diuraikan terlebih dahulu menjadi komponen-komponen asam aminonya dan kemudian dilakukan proses derivatisasi. Penguraian protein dapat dilakukan melalui cara hidrolisis dengan larutan HCl 6N pada suhu 110°C selama 24 jam dalam tabung tertutup, protein yang terkandung dalam contoh diharapkan terurai dengan sempurna menjadi asam-asam amino bebas sehingga diharapkan hasil analisa asam-asam amino sesuai dengan komposisi asam-asam amino yang sebenarnya dalam contoh.

Proses derivatisasi yang dipilih adalah sistem Pico-Tag dengan pereaksi derivatisasi fenilisotiosianat (PITC). Pereaksi ini mampu mendeteksi asam amino primer dan sekunder dalam satu tahap reaksi (Bidlingmeyer, 1984 & Li, Lim, 1994). Dengan sistem ini, analisa asam amino dapat diselesaikan dalam waktu 21 menit dengan batas deteksi 1 pikomol⁽⁶⁾.

BAHAN DAN METODA

Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan adalah sebagai berikut :

L- α -amino butirat (AABA = L- α -Amino Butiric Acid), L-asam sisteat (CYA = L-Cysteic Acid), metionin sulfon (METO2 = L-Methionine Sulfone), standar asam amino PIERCE H. No NCI 0180, yang semuanya diperoleh dari SIGMA Chemical Company-USA, tembaga sulfat pentahidrat, kalium sulfat, asam sulfat, asam borat, asam klorida, natrium asetat trihidrat semuanya dari MERCK, trietilamin (TEA) dari ALDRICH, etilen diamin tetra asetat (EDTA), asam asetat glasial, asetonitril, gas N₂, fenilisotiosianat (PITC), dinatrium hidrogen fosfat, asam fosfat 10%, hidrogen peroksida 30%, asam format, oktanol, hidrogen bromida 47%, kolom Pico-Tag C₁₈ WATERS, dry ice, dan aquadest dengan kualitas KCKT.

Peralatan

Peralatan derivatisasi terdiri dari termos VAC SEAL JENCONS (England), vial, pinset, satu unit peralatan vakum Pico-Tag (USA), pompa vakum EDWARD E2M8, dan jarum suntik dalam skala mikroliter (CAMAG-HAMILTON). Satu unit peralatan KCKT terdiri atas dua buah pompa HPLC 510-WATERS, pengatur suhu T CM-WATERS, pengatur elusi gradien yang otomatis 680-

WATERS, injektor model U6K-WATERS, detektor UV/Vis JASCO UV-970 (Japan), Integrator SPECTRA PHYSIC 4290.

Prosedur Pengerjaan

Pembuatan Standar Asam Amino

1. Dibuat campuran larutan yang terdiri AABA 6,25 μ mole/ml, METO2 25 μ mole/ml, dan CYA 25 μ mole/ml, yang dilarutkan dengan HCl 10 mM
2. larutan di atas dicampur dengan larutan standar asam amino PIERCE H.
3. Selanjutnya dilakukan proses derivatisasi standar dengan menggunakan pereaksi derivatisasi yang terdiri dari metanol/air/TEA/PITC
4. hasil derivatisasi dilarutkan dengan sampel diluent (larutan dinatrium hidrogen fosfat pH 7,4). Standar ini siap diinjeksikan ke dalam kolom KCKT

Preparasi Fasa Gerak

Fasa gerak terdiri dari pelarut A dan pelarut B. Pelarut A dibuat dari campuran larutan natrium asetat trihidrat, TEA dan asam asetat glacial dengan pH 5,7. Sedangkan untuk pelarut B terdiri dari campuran asetonitril, dan aquadest. Masing-masing pelarut ditambah larutan EDTA

2,69mM dan Selanjutnya campuran larutan dimasukkan ke dalam botol coklat dan ke dalamnya dialiri gas N₂.

Kurva Kalibrasi Standar Asam Amino

Asam Amino standar yang telah dipisahkan, ditentukan daerah linieritas detector dengan cara membuat kurva kalibrasi dengan jalan mengalurkan data luas puncak yang diperoleh dari integrator terhadap konsentrasi standar.

Proses Hidrolisa Protein Menggunakan HCl 6N

Kadar protein perlu ditentukan, karena untuk analisa selanjutnya penimbangan dilakukan dalam bentuk mg protein. Adapun metoda penentuan protein adalah sebagai berikut Penganalisaan asam amino yang terdapat dalam contoh perlu melakukan penguraian protein terlebih dahulu dengan jalan hidrolisa. Metoda yang dilakukan adalah menghilangkan lemak yang terdapat pada pakan dengan cara ekstraksi menggunakan n-heksana dan selanjutnya dilakukan proses hidrolisa dengan menggunakan HCl 6N dan dilakukan proses pemanasan dalam oven pada temperatur 110°C selama 24 jam. Kemudian

ditambahkan larutan AABA 2,5 ml selanjutnya dilakukan proses derivatisasi.

Oksidasi Contoh dengan Asam Performat untuk Penentuan Asam Sisteat dan Metionin Sulfon

Contoh yang telah didinginkan dalam penangas es ditambah larutan asam performat dan didinginkan selama 16 jam dalam lemari pendingin pada temperatur 4°C. Pada keadaan temperatur masih 4°C, ditambahkan oktanol dan hydrogen bromida 47%, kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator pada temperatur 44°C. Selanjutnya dilakukan proses hidrolisa

menggunakan HCl 6N, pemanasan pada temperatur 110°C, dan penambahan AABA 2,5 µmol/ml. Pada tahap ini juga dilakukan proses derivatisasi seperti proses derivatisasi standar.

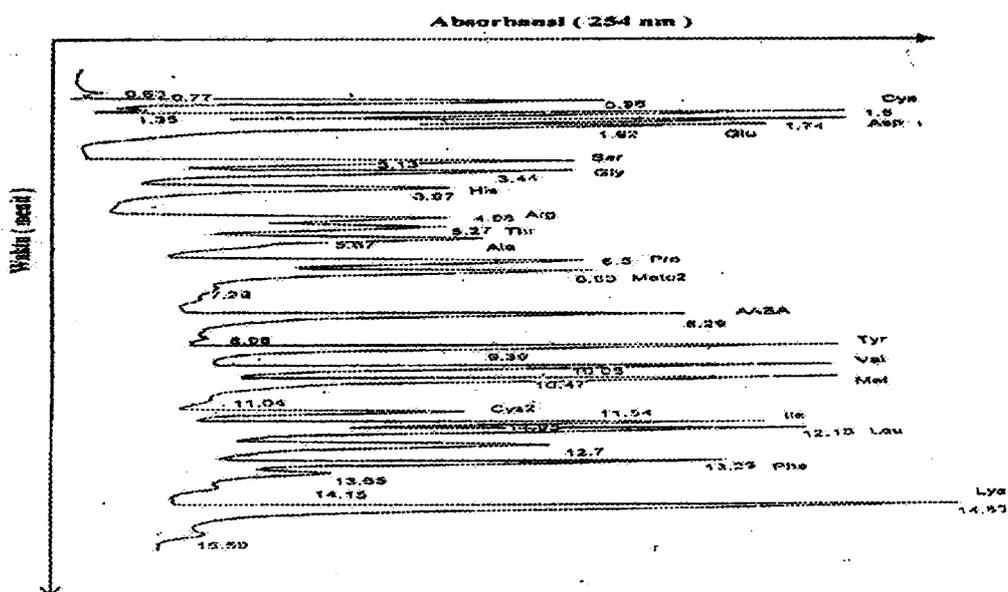
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemisahan Standar Asam Amino

Kromatogram hasil pemisahan derivat asam amino dari standard PIERCE H dan standar dalam yang terdiri dari AABA 2,5 µmol/ml, CYA 2,5 µmol/ml, METO 2,5 µmol/ml dapat dilihat pada Gambar 1 dan retensi relatif dari setiap asam amino terhadap AABA dapat dihitung seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. : Standar asam amino yang dapat dipisahkan

No	Asam Amino	tr	Rr	No	Asam Amino	tr	Rr
1	Cya	1,50	0,1809	11	Meto2	6,83	0,8239
2	Asp	1,74	0,2099	12	AABA sebagai standar dalam	8,29	1,0000
3	Glu	1,92	0,2316	13	Tyr	9,39	1,1327
4	Ser	3,13	0,3776	14	Val	10,08	1,2159
5	Gly	3,44	0,4150	15	Met	10,47	1,2630
6	His	3,97	0,4789	16	Cys2	11,54	1,3920
7	Arg	4,98	0,6007	17	Ile	11,95	1,4415
8	Thr	5,27	0,6357	18	Leu	12,18	1,4692
9	Ala	5,67	0,6840	19	Phe	13,29	1,6031
10	Pro	6,50	0,7841	20	Lys	14,83	1,7889



Gambar 1 : Kromatogram pemisahan dari standar asam amino

Kromatogram ini selanjutnya digunakan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa asam amino yang ada pada contoh. Untuk mengetahui urutan keluarnya asam amino dapat digunakan pola kromatogram yang diperoleh dari literatur⁽¹⁾.

Asam amino yang dapat dipisahkan dari kolom KCKT ada 20 jenis. Selain itu terdapat tiga puncak yang tinggi tetapi bukan merupakan asam amino. Adapun puncak tersebut mempunyai waktu retensi 0,96 ; 12,7 dan 13,65 . Puncak-puncak tersebut diduga

adalah ketidakmurnian yang berasal dari pereaksi yang digunakan. Retensi relatif dari standar asam amino berfungsi sebagai pedoman untuk menentukan komponen asam amino pada contoh, karena retensi relatif dari standar asam amino dan komponen asam amino pada contoh seyogyanya sama.

Kurva Kalibrasi Standar Asam Amino

Dengan kondisi pemisahan seperti di atas dicoba untuk menentukan daerah linieritas detektor dengan membuat kurva kalibrasi dengan jalan mengalurkan data luas

puncak yang diperoleh dari integrator terhadap konsentrasi standar asam amino.

Tabel 2. memperlihatkan rentang konsentrasi yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi, koefisien korelasi dan persamaan regresi dari masing masing asam amino.

Rentang konsentrasi berasal dari 5 konsentrasi yang berbeda Respon detektor dari 20 asam amino tersebut cukup linier dengan koefisien korelasi hampir mendekati satu.

Tabel 2. : Rentang konsentrasi masing-masing asam amino untuk memperoleh koefisien korelasi dan persamaan regresi

No	Asam Amino	Jumlah yang Diinjeksikan (ng)	Koef.korelasi	Persamaan Regresi
1	Cya	5,2544 - 10,5088	0,9708	$Y = 1808,7020 + 4571,3047 X$
2	Asp	4,1594 - 8,0318	0,9905	$Y = 3430,2596 + 5050,9658 X$
3	Glu	2,2989 - 4,5978	0,9915	$Y = 11497,2619 + 9894,6799 X$
4	Ser	1,6420 - 3,2841	0,9464	$Y = 9853,6346 + 13420,2129 X$
5	Gly	1,1730 - 2,3459	0,9905	$Y = 5809,5241 + 20372,6889 X$
6	His	2,4244 - 4,8488	0,9636	$Y = 14058,5692 + 8799,8932 X$
7	Arg	5,4438 - 10,8875	0,9679	$Y = 13242,0663 + 3783,4330 X$
8	Thr	1,8613 - 3,7225	0,9750	$Y = 7284,3436 + 11026,8119 X$
9	Ala	2,7841 - 5,5681	0,9750	$Y = 10488,3679 + 8444,4904 X$
10	Pro	1,7989 - 3,5978	0,9514	$Y = 12558,1087 + 14795,7019 X$
11	Meto2	5,6625 - 11,3250	0,9670	$Y = 27145,6654 + 7164,9201 X$
12	AABA	3,2225 - 6,4450	0,9526	$Y = 16798,2248 + 8256,2242 X$
13	Tyr	2,8311 - 5,6622	0,9298	$Y = -13832,1791 + 16096,5968 X$
14	Val	1,8305 - 3,6609	0,9345	$Y = -7560,9224 + 19016,7105 X$
15	Met	2,3314 - 4,6628	0,9379	$Y = -12856,7865 + 18824,5133 X$
16	Cys2	7,5094 - 15,0198	0,9813	$Y = -8642,2082 + 3050,2982 X$
17	Ile	2,0495 - 4,0991	0,9950	$Y = -1644,9950 + 11820,4833 X$
18	Leu	2,0495 - 4,0991	0,9989	$Y = -5476,4218 + 18840,7669 X$
19	Phe	2,5800 - 5,1600	0,9963	$Y = -343,2390 + 20866,3602 X$
20	Lys	2,2842 - 4,5684	0,9961	$Y = 5002,0907 + 16905,5845 X$

Batas Minimum Penentuan

Dari kurva kalibrasi yang diperoleh untuk setiap asam amino, dan dengan menggunakan persamaan $Y_m = Y_B + 3SB$ dapat

diperoleh batas minimum penentuan dari masing-masing asam amino. Hasil perhitungan untuk setiap jenis asam amino yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. : Batas minimum penentuan standar asam amino

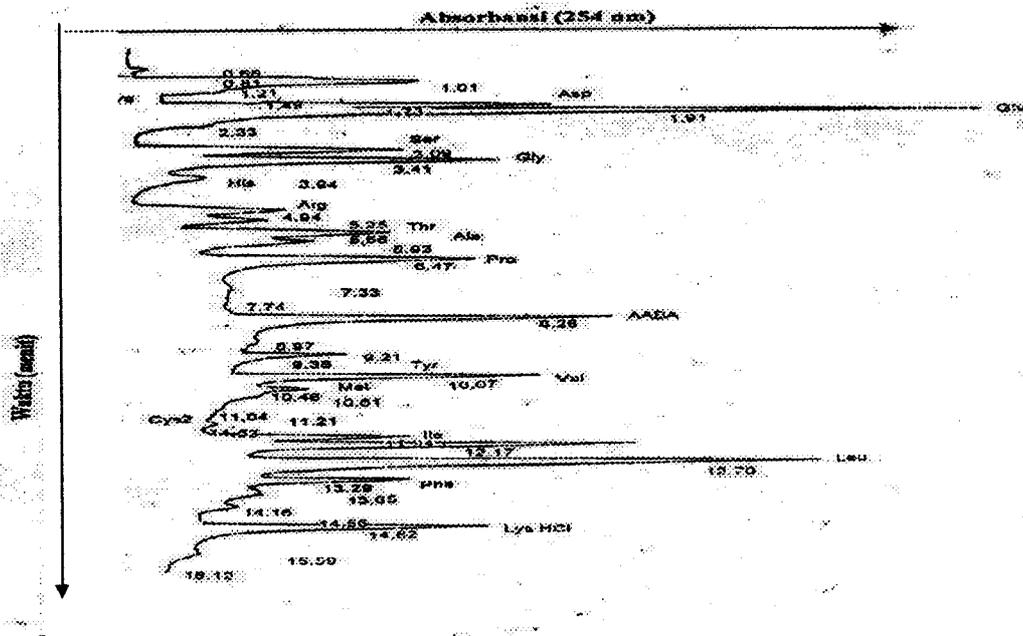
No	Asam Amino	Batas Minimum Penentuan (ng)	No	Asam Amino	Batas Minimum Penentuan (ng)
1	Cya	1,7827	11	Meto2	2,0508
2	Asp	0,7918	12	AABA	1,4138
3	Glu	0,4137	13	Tyr	1,5401
4	Ser	0,7700	14	Val	0,9579
5	Gly	0,2233	15	Met	1,1852
6	His	0,9239	16	Cys2	2,0264
7	Arg	1,9435	17	Ile	0,2825
8	Thr	0,5834	18	Leu	0,1294
9	Ala	0,8715	19	Phe	0,3065
10	Pro	0,8005	20	Lys	0,2777

Proses Hidrolisa Protein pada Contoh

Dari percobaan sebelumnya, banyaknya kandungan protein yang digunakan agar diperoleh hasil hidrolisa yang optimal adalah sebesar 30 mg protein. Gambar 2. adalah kromatogram pemisahan komponen-komponen asam amino dari contoh pakan ayam.

Dari kromatogram terlihat bahwa sistin dengan waktu retensi 11,53 (Rr : 1,3925) dan metionin dengan waktu retensi 10,46 (Rr : 1,2630) memiliki puncak yang sangat kecil sekali atau hampir tidak tampak. Kecilnya puncak sistin dipengaruhi oleh karbohidrat yang ada pada hidrolisat. Pada proses

hidrolisa, selain protein komponen bahan lainnya seperti karbohidrat akan mengalami penguraian dan membentuk senyawa humin yang berwarna coklat tua. Senyawa humin berupa partikel-partikel yang dapat menyerap sistin. Makin banyak senyawa humin yang terbentuk makin banyak sistin yang hilang⁽³⁾. Sedangkan kecilnya puncak metionin disebabkan karena metionin mengalami kerusakan akibat proses oksidasi oleh oksigen dari udara membentuk metionin sulfoksida yang tidak tampak sebagai salah satu puncak.



Gambar 2. : Kromatogram pemisahan asam-asam amino dari contoh pakan ayam

Kerusakan metionin dan sistin dapat diatasi melalui perbaikan cara hidrolisis. Cara yang dapat dipakai adalah dengan melakukan proses oksidasi terlebih dahulu terhadap protein menggunakan asam performat, sebelum dilakukan proses hidrolisis dengan HCl 6N. Dengan proses oksidasi menggunakan asam performat, maka gugus metionin dan sistin yang terdapat pada rantai AA dari protein akan dioksidasi. Hasil

oksidasinya cukup stabil dalam suasana hidrolisis dengan HCl 6N. Sebagai hasil hidrolisis terbentuk asam sisteat dan metionin sulfon.

Pada Tabel 4 tercantum hasil analisa kualitatif dari pakan ayam. Jenis asam amino yang terdapat pada pakan ayam dapat dilihat dari kolom terakhir pada Tabel 4. Jenis asam amino untuk pakan sapi dan ikan sama seperti yang terdapat pada pakan ayam.

Analisa Kualitatif

Tabel 4. : Nilai Rr pada contoh dibandingkan nilai Rr pada standar untuk mengidentifikasi komponen asam amino

tr komponen contoh	Rr pada contoh	Rr standar asam amino	Identifikasi
1,49	0,1800	0,1809	Cya
1,73	0,2089	0,2099	Asp
1,91	0,2307	0,2316	Glu
3,09	0,3732	0,3776	Ser
3,41	0,4118	0,4150	Gly
3,94	0,4758	0,4789	His
4,94	0,5966	0,6007	Arg
5,25	0,6341	0,6357	Thr
5,66	0,6836	0,6840	Ala
6,47	0,7814	0,7841	Pro
8,28	1,0000	1,0000	AABA
9,38	1,1329	1,1327	Tyr
10,07	1,2162	1,2159	Val
10,46	1,2633	1,2630	Met
11,53	1,3925	1,3920	Cys2
11,94	1,4420	1,4415	Ile
12,17	1,4698	1,4692	Leu
13,29	1,6051	1,6031	Phe
14,82	1,7899	1,7889	Lys

*Diambil dari Tabel.1

Kromatogram pada Gambar 3, adalah kromatogram setelah contoh dioksidasi dengan asam performat. Dari gambar tersebut asam sisteat (Cya) mempunyai waktu retensi 1,53 (Rr : 0,1824) dan metionin sulfon (Meto2) waktu retensinya 7,07 (Rr : 0,8427).

Dengan demikian terlihat bahwa oksidasi dengan asam performat dapat mencegah kerusakan sistin oleh karbohidrat, dengan cara mengoksidasi sistin menjadi asam sisteat.

Penggunaan asam performat yang berlebih dalam proses oksidasi harus

dihilangkan sebelum dilakukan hidrolisis dengan HCl 6N, karena akan mengganggu dalam analisa. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan menambahkan HBr, akan tetapi ternyata HBr dapat mengakibatkan terjadi brominasi terhadap histidin dan tirosin ⁽⁵⁾.

Dari Tabel 5. Tampak pada identifikasi puncak bahwa bukan hanya histidin dan tirosin yang rusak, karena terdapat beberapa asam amino lain yang tidak tampak puncaknya (serin, histidin, arginin, prolin, tirosin, metionin, sistin, fenilalanin, lisin).

Tabel 5.A. :
 Retensi relatif dari standar asam amino yang dapat dipisahkan

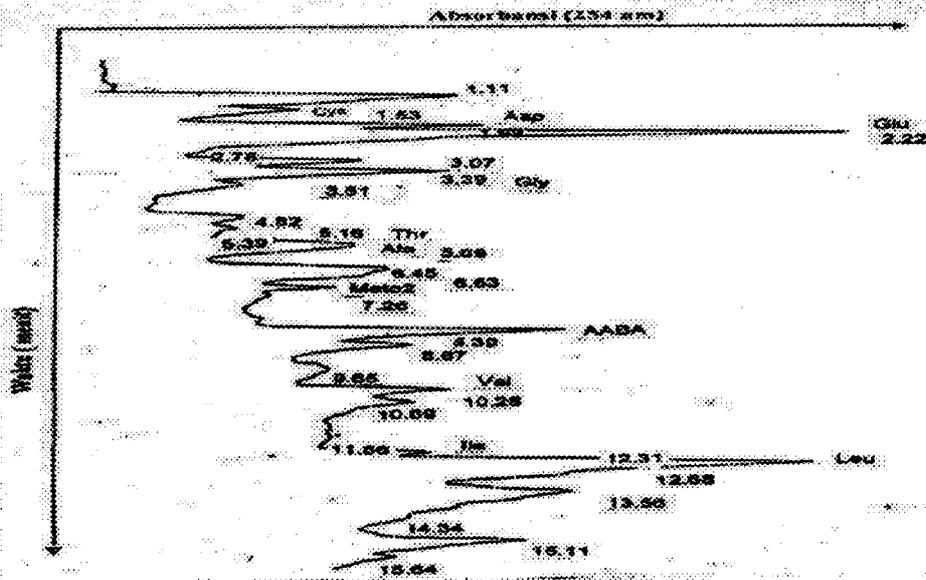
Asam Amino	tr pada standar	Rr pada standar*
Cya	1,52	0,1786
Asp	2,01	0,2362
Glu	2,21	0,2597
Ser	3,09	0,3631
Gly	3,44	0,4042
His	3,93	0,4618
Arg	4,93	0,5793
Thr	5,30	0,6228
Ala	5,81	0,6827
Pro	6,79	0,7979
Meto2	7,13	0,8378
AABA	8,51	1,0000

Tabel 5.B.
 Identifikasi komponen AA setelah contoh dioksidasi dengan asam performat

tr komponen contoh	Rr contoh*	Identifikasi puncak
1,11	0,1323	
1,53	0,1824	Cya
1,99	0,2372	Asp
2,20	0,2622	Glu
2,78	0,3313	
3,07	0,3659	
3,39	0,4041	Gly
3,81	0,4541	
4,82	0,5745	
5,16	0,6150	Thr
5,39	0,6424	
5,69	0,6782	Ala
6,45	0,7688	
6,63	0,7902	
7,07	0,8427	Meto2
7,26	0,8653	
8,39	1,0000	AABA
8,87	1,0572	

Tyr	9,63	1,1316	9,65	1,1502	
Val	10,43	1,2256	10,28	1,2253	Val
Met	10,76	1,2644			
Cys	11,94	1,4031	10,69	1,2741	
Ile	12,54	1,4736	11,86	1,4136	
Leu	12,82	1,5065	12,31	1,4672	Ile
			12,68	1,5113	Leu
Phe	13,83	1,6251	13,56	1,6162	
			14,34	1,7092	
Lys	15,37	1,8061	15,11	1,8010	
			15,64	1,8641	

*dihitung terhadap AABA



Gambar 3. : Kromatogram pemisahan asam-asam amino dari contoh pakan ayam yang dioksidasi dengan asam performat.

Analisa Kuantitatif

Kandungan AA dalam contoh pakan ayam, sapi, dan ikan dapat ditentukan setelah masing-masing asam amino dipisahkan dan diperoleh data luas puncak.

Dengan membandingkan luas puncak setiap jenis asam amino yang ada pada contoh terhadap luas puncak asam amino yang sesuai pada standar dapat dihitung kandungan asam amino pada contoh pakan.

Tabel 6. : Kandungan masing-masing komponen asam amino pada pakan ayam

No	Asam Amino	Kandungan AA dalam contoh (mg/gr)		
		Pakan Ayam	Pakan Sapi	Pakan Ikan
1	Cya			
2	Asp	3,0279	2,5089	3,6237
3	Glu	2,3373	2,9315	3,7912
4	Ser	0,7469	0,7706	1,1290
5	Gly	0,7124	0,7394	1,0783
6	His	0,5823	0,7732	1,1094
7	Arg	1,5793	1,8883	1,9579
8	Thr	0,4779	0,4070	0,5308
9	Ala	1,6137	0,8224	2,1028
10	Pro	1,4845	0,9551	1,5883
11	Meto2	-	-	-
12	AABA	-	-	-
13	Tyr	0,6309	0,4323	0,8298
14	Val	0,2817	0,9862	1,3304
15	Met	0,6612	0,2097	0,4453
16	Cys2	1,9867	1,9029	2,8770
17	Ile	0,4792	0,4499	0,7259
18	Leu	3,4632	4,6939	6,6880
19	Phe	1,6722	5,0592	8,5097
20	Lys HCl	0,8497	1,9051	2,8607

Dari contoh yang dioksidasi dengan asam performat dapat ditentukan kandungan metionin dan sistin pada pakan melalui

perhitungan luas puncak asam sisteat dan metionin sulfon. Hasil perhitungannya dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. : Pengaruh oksidasi asam performat terhadap kandungan asam amino

No	Asam Amino	Kons. Pada Contoh Pakan (mg/g)		
		Ayam	Sapi	Ikan
3	Cya	5,5015	2,2642	4,4120
4	Meto2	4,7451	0,6694	1,1795

KESIMPULAN

1. Dengan metoda Kjeldahl, diperoleh kandungan protein masing-masing contoh pakan, sehingga diketahui berapa banyak contoh yang diperlukan untuk memperoleh kandungan protein tertentu.
2. Batas deteksi minimum yang dapat dicapai relatif kecil, sehingga memungkinkan metoda ini digunakan untuk analisa kualitatif dan kuantitatif asam-asam amino pada contoh pakan.
3. Dari analisa contoh pakan diperoleh 17 jenis asam amino.
4. Penentuan sistin dan metionin sebaiknya dilakukan setelah contoh dioksidasi dengan asam performat, sehingga kedua jenis asam amino tersebut diatas dianalisa dalam bentuk asam sisteat dan metionin sulfon.

DAFTAR PUSTAKA

- Cohen, S.A., dan Michael Meys, [1995], *The Pico-Tag Method dalam Millipore A Manual of Advanced Tehnicques for Amino Acid Analysis*, Corporation, USA
- Krstulovic, A.M., [1982], *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*, John Wiley, New York, hal. 207-220.
- Lugg, J.W.H., [1933], *Investigation of Sources of Error in The Estimation of Tyrosin and Tryptophan in Complex Materials which Associated with Hydrolysis*, Biochem. Journal 32 : hal. 775-778.
- Tarvin, T.L, Cohen, S.A dan Bidlingmeyer, B.A, [1984], *Analysis of Amino Acid using Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate*, American Laboratory
- Spindler, M., Stadler, R. dan Tanner, H., [1984], *Amino acid Analysis of Feedstuffs: determination of methionine and cystine after oksidation with performic acid and hydrolysis*, J. Agri. Food Chem., 32: hal. 1366-1371
- Sumartini, S., dan Kantasubrata, J., [1989], *Analisa Asam Amino*, Puslitbang Kimia Terpan-LIPI, Bandung.