

# KROMATOGRAFI LAPISAN TIPIS (KLT) DAN KROMATOGRAFI CAIRAN KINERJA TINGGI (KCKT) DARI SOLASODIN, AD DAN ADD

Julia Kantasubrata, Loyniwati, Jamilah dan A.T. Karossi

Puslitbang Kimia Terapan - LIPI  
Jalan Cisu - Sangkuriang, Bandung 40135

## INTISARI

Metoda KLT dan KCKT telah digunakan untuk memisahkan solasodin, 4-androstene-3,17-dione (AD) dan 1,4-androsta-diene-3,17-dione (ADD) yang dihasilkan dari biokonversi solasodin menggunakan *Mycobacterium phlei* DSM 43286. Dalam usaha menghemat pemakaian bahan pada proses pemisahan dengan KCKT, maka kondisi pemisahan pada KCKT dapat dicari melalui metoda KLT. Telah dicoba untuk menggunakan dua macam interaksi kromatografi yaitu kromatografi fasa normal menggunakan silika sebagai fasa diam dan kromatografi fasa terbalik dengan jenis fasa diam  $C_{18}$ . Untuk kromatografi fasa normal, ternyata solasodin yang mempunyai nilai  $R_f$  relatif kecil, masih belum dapat terelusi keluar dari kolom, sedangkan pada kromatografi fasa terbalik solasodin baru dapat terelusi keluar dari kolom setelah digunakan bufer tris sebagai salah satu komposisi eluen. Pelarut yang dapat dipilih sebagai eluen untuk pemisahan ini terbatas pada jenis pelarut yang mempunyai UV-Cut-Off relatif rendah, karena deteksi solasodin dilakukan pada panjang gelombang 205 nm. Batas deteksi minimum 4-androstene-3,17-dione (AD) dan 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) yang diukur pada panjang gelombang 240 nm berturut-turut adalah 0,92 ng dan 1,54 ng, sedangkan jumlah terkecil senyawa solasodin yang dapat dideteksi pada panjang gelombang 205 nm adalah 3,39 ng. Detektor diodearray dapat digunakan untuk mengkonfirmasi puncak senyawa yang terbentuk dalam proses biokonversi tersebut.

## ABSTRACT

Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) have been used to separate solasodine, 4-androstene-3,17-dione (AD) and 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) resulted from bioconversion process of solasodine using *Mycobacterium phlei* DSM 43286. In order to minimize the consumption of materials, the separation condition of HPLC could be looked for through TLC method. Two kinds of chromatographic interaction i.e. normal phase and reversed phase chromatography using respectively silica and  $C_{18}$  as stationary phase have been tried. In normal phase chromatography, there are still difficulties for eluting solasodine from silica column, since solasodine has relatively low  $R_f$  value. While in reversed phase chromatography, solasodine could be eluted from  $C_{18}$  column, only if the mobile phase is buffered. The selection of solvent systems for this separation should also consider the relatively low UV-Cut-Off of individual solvent, since detection of solasodine requires operation at 205nm. The minimum limit detection which is measured at 240 nm was found to be 0.92 ng AD and 1.54 ng ADD, while the smallest amount of solasodine which could be detected at 205 nm was 3.39 ng. Diode array detector could be used for confirming the solute peaks produced in bioconversion process.

## PENDAHULUAN

Sehubungan dengan studi biokonversi solasodin untuk menghasilkan AD dan ADD, dibutuhkan suatu metoda pemisahan dari solasodin dan hasil biokonversinya. Untuk keperluan ini, metoda KCKT merupakan pilihan yang tepat karena metoda tersebut dapat mencakup metoda pemisahan dan penentuannya baik secara kualitatif maupun kuantitatif.

Untuk mendapatkan kondisi pemisahan yang optimal pada KCKT, dapat digunakan KLT yang relatif lebih cepat dan murah. KLT memiliki mekanisme pemisahan komponen yang sama dengan KCKT. Data retensi yang diperoleh dari pelat KLT dapat dipindahkan dan digunakan pada kolom KCKT. Dengan demikian dimungkinkan mencari kondisi pemisahan pada KCKT melalui KLT, karena memang jenis fasa diam dan fasa gerak pada kedua jenis kromatografi ini serupa (1,2,3,4,5).

Dicari mula-mula kondisi pemisahan untuk kromatografi fasa normal menggunakan pelat silika. Kondisi pemisahan KLT yang memberikan hasil cukup baik diaplikasikan pada KCKT menggunakan kolom silika. Masih ditemukan kendala mengenai proses elusi dan deteksi senyawa solasodin pada kromatografi fasa normal (6). Pengukuran solasodin dengan sinar UV harus dilakukan pada panjang gelombang relatif rendah (205 nm). Apabila dikaitkan dengan penggunaan peralatan KCKT, pengukuran menggunakan detektor UV pada daerah panjang gelombang yang relatif rendah ini akan menimbulkan permasalahan. Hal ini disebabkan karena banyak pelarut organik yang umum digunakan sebagai eluen menyerap pada daerah panjang gelombang tersebut. Pelarut organik yang paling aman untuk digunakan pada daerah panjang gelombang tersebut adalah asetonitril, yang mempunyai UV-Cut-Off yang relatif rendah yaitu 195 nm (7).

Dengan latar belakang permasalahan diatas, pada penelitian ini dicoba dikembangkan pemisahan solasodin, AD dan ADD pada kromatografi fasa terbalik, menggunakan campuran asetonitril/air sebagai eluen. Keuntungan tambahan dalam penggunaan kromatografi fasa terbalik ini adalah biaya analisa yang relatif murah, karena menggunakan jenis pelarut yang jauh lebih murah dibandingkan dengan yang digunakan pada kromatografi fasa normal.

Komposisi pelarut yang digunakan pada kromatografi fasa terbalik ini mengandung air dengan persentase yang relatif besar, sehingga biaya analisa menjadi relatif rendah. Hal ini menjadi penting mengingat akan digunakannya KCKT sebagai metoda untuk memantau secara rutin berlangsungnya kemajuan proses biokonversi solasodin (8).

Mengingat besar kemungkinan didalam contoh campuran hasil fermentasi terdapat pula senyawa-senyawa lain yang mempunyai  $t_r$  sama atau hampir sama dengan AD/ADD, maka tidaklah cukup apabila identifikasi senyawa hanya dilakukan dengan cara membandingkan  $t_r$  yang diperoleh. Identitas senyawa dapat diketahui dengan lebih jelas, antara lain dengan membandingkan spektrum serapan senyawa tersebut dengan standar, menggunakan detektor *diodearray*. Apabila spektrum serapan dari senyawa yang dikonfirmasi sama dengan spektrum serapan standar AD/ADD, maka dapat diduga bahwa dalam campuran hasil fermentasi tersebut memang terbentuk AD dan ADD. Sebaliknya apabila spektrum serapan keduanya tidak sama, maka berarti puncak yang dihasilkan pada kromatogram contoh campuran hasil fermentasi bukan berasal dari senyawa AD dan ADD, tetapi kebetulan mempunyai  $t_r$  sama dengan  $t_r$  AD atau  $t_r$  ADD.

## BAHAN DAN METODA

### Bahan yang digunakan

Standar Solasodin, Solanesol, 4-androstene-3,17-dione (AD), 1,4-androsta-diene-3,17-dione (ADD), berasal dari SIGMA. Pelat analitik adalah Silika GF<sub>254</sub> (EM 5554) dan RP-18<sub>254</sub> (EM 15865). Kolom yang digunakan terdiri dari kolom Silika  $\mu$ -Porasil WATERS, kolom  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> WATERS, kolom Zorbax SIL dan Zorbax ODS. Pelarut yang digunakan sebagai komposisi eluen diperoleh dari E.MERCK. Larutan bufer tris dibuat dengan melarutkan sejumlah tris(hidroksi-metil)aminometana (SIGMA T-1503) dalam air hingga konsentrasi 1 M. Sejumlah volume larutan 1 M ini diencerkan hingga mencapai konsentrasi yang diinginkan dan pH diatur dengan larutan HCl 0,1 M hingga mencapai nilai pH  $7 \pm 0,1$ .

### Peralatan yang digunakan

Peralatan KLT terdiri dari pipa kapiler, templet, bejana kromatografi, alat penyemprot, lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Satu unit peralatan KCKT terdiri dari: Pompa BECKMAN 110B, Detektor UV BECKMAN M163 dengan panjang gelombang yang dapat diatur pada daerah pengukuran UV/VIS dan Integrator SPECTRA PHYSICS 4290. Satu unit peralatan KCKT SHIMADZU LC 6A lengkap dengan detektor *diodearray* SPD M6A, Komputer IBM dan Printer P 5300.

### Pemisahan Solasodin, AD dan ADD pada Pelat Silika dan C<sub>18</sub>

Pada pemisahan ini digunakan pelat silika GF<sub>254</sub> dan pelat C<sub>18</sub> yang mengandung indikator fluoresensi. Komposisi pelarut yang digunakan, dicari dari campuran pelarut yang umum digunakan untuk pemisahan steroid. Apabila harga  $hR_f$  yang diperoleh belum cukup memadai, maka dilakukan modifikasi jenis dan komposisi pelarut, didasarkan pada deret eluotropik pelarut. Pelat hasil elusi mula-mula dilihat dibawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm. Senyawa AD dan ADD akan tampak sebagai noda berwarna ungu. Senyawa solasodin tidak dapat terdeteksi dengan cara ini sehingga untuk mendeteksinya, pelat disemprot dengan pereaksi asam sulfat 50% dalam etanol. Setelah disemprot, pelat kemudian dipanaskan dalam oven 80°C selama 10 menit. Senyawa solasodin akan tampak sebagai noda berwarna merah keungu-unguan dan apabila pemanasan dilanjutkan hingga  $\pm 25$  menit, senyawa AD akan tampak sebagai noda berwarna hijau, sedangkan senyawa ADD sebagai noda berwarna jingga kemerah-merahan.

### Pemisahan Solasodin, AD dan ADD pada Kolom Silika dan C<sub>18</sub>

Hasil pemisahan pada pelat KLT dicoba diaplikasikan pada kolom KCKT. Modifikasi dari jenis dan komposisi pelarut yang digunakan didasarkan pada pelarut yang memberikan resolusi pemisahan cukup baik diatas pelat. Dalam melakukan optimasi pemilihan pelarut, diperhatikan pula nilai *UV-Cut-Off* pelarut yang ada hubungannya dengan limit deteksi minimum senyawa. Usaha untuk mengurangi peristiwa *tailing* dari puncak solasodin pada kromatografi fasa terbalik ditempuh dengan jalan mencampurkan bufer tris kedalam eluen. Apabila dari kromatogram contoh hasil biokonversi didapatkan puncak senyawa yang mempunyai  $t_r$  sama dengan  $t_r$  AD atau ADD, maka untuk contoh yang bersangkutan dilakukan konfirmasi puncak menggunakan detektor *diodearray*. Spektrum serapan dari senyawa yang diduga AD/ADD dicoba dihipitkan dengan spektrum serapan standar AD/ADD, untuk melihat apakah memang puncak dengan  $t_r$  yang sama berasal dari senyawa yang identik dengan standar.

## HASIL DAN DISKUSI

### Pemisahan Solasodin, AD dan ADD pada Pelat Silika dan C<sub>18</sub>

Diperoleh sebelas macam eluen yang dapat memberikan resolusi pemisahan cukup baik untuk solasodin, AD dan ADD pada pelat silika seperti tampak pada Tabel 1. Dari letak ketiga noda pada pelat, dapat disusun urutan polaritas dari ketiga senyawa sebagai berikut: solasodin > ADD > AD.

Tabel 1. Pemisahan solasodin, AD dan ADD pada pelat Silika

| Jenis dan Komposisi Pelarut                                                 | hR <sub>f</sub> |     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----|----|
|                                                                             | Solasodin       | ADD | AD |
| A. CCl <sub>4</sub> - CH <sub>3</sub> CN - CH <sub>3</sub> OH<br>10 : 1 : 1 | 56              | 76  | 84 |
| B. n-Heksana - Aseton<br>47 : 53                                            | 64              | 71  | 76 |
| C. n-Heksana - Isopropanol<br>75 : 25                                       | 56              | 64  | 73 |
| D. Butanol - Toluena - CCl <sub>4</sub><br>1 : 1 : 5                        | 26              | 52  | 59 |
| E. Heksana-Etil asetat-Butanol<br>6 : 4 : 2                                 | 51              | 79  | 86 |
| F. n-Heksana-Butanol-CHCl <sub>3</sub><br>5 : 3 : 1                         | 50              | 74  | 81 |
| G. CCl <sub>4</sub> -Etil asetat-Metanol<br>10 : 2 : 1                      | 39              | 57  | 61 |
| H. Toluena-Etil asetat-Etanol<br>10 : 4 : 1                                 | 30              | 63  | 71 |
| I. Toluena-Etilasetat-Metanol<br>10 : 2 : 1                                 | 29              | 60  | 69 |
| J. Butanol - CCl <sub>4</sub><br>1 : 7                                      | 26              | 45  | 55 |
| K. CCl <sub>4</sub> -Aseton-Isopropanol<br>14 : 1 : 2                       | 43              | 64  | 74 |

Pada penggunaan pelat C<sub>18</sub>, diperoleh 4 macam komposisi pelarut yang dapat memberikan resolusi cukup baik seperti tampak pada Tabel 2. Ternyata dugaan semula bahwa urutan elusi disini akan menjadi terbalik apabila dibandingkan dengan kromatografi fasa normal tidak

Tabel 2. Pemisahan Solasodin, AD dan ADD pada pelat C<sub>18</sub>

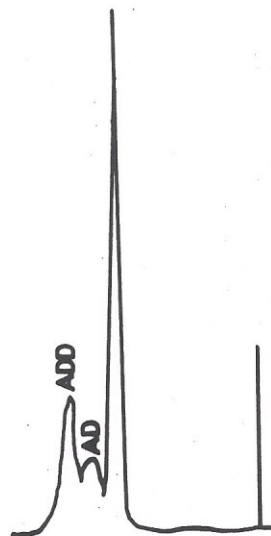
| Jenis dan Komposisi Pelarut             | hR <sub>f</sub> |    |     |
|-----------------------------------------|-----------------|----|-----|
|                                         | Solasodin       | AD | ADD |
| A. Metanol                              | 36              | 57 | 63  |
| B. Asetonitril-Metanol<br>70 : 30       | 62              | 70 | 74  |
| C. Asetonitril-Air<br>94 : 6            | 32              | 56 | 59  |
| D. Metanol-Isopropanol-Air<br>3 : 2 : 1 | 47              | 53 | 59  |

sepenuhnya terjadi. Urutan elusi AD dan ADD memang terbalik. Pada kromatografi fasa normal hR<sub>f</sub> AD > hR<sub>f</sub> ADD sedangkan pada kromatografi fasa terbalik hR<sub>f</sub> AD < hR<sub>f</sub> ADD. Akan tetapi senyawa solasodin tetap mempunyai

nilai hR<sub>f</sub> yang paling rendah dengan bentuk noda sedikit berekor. Terbentuknya noda yang berekor pada senyawa solasodin, kemungkinan disebabkan oleh adanya interaksi tambahan antara gugus fungsi yang terdapat pada molekul tersebut dengan gugus-gugus silanol sisa dari fasa diam atau karena kelarutan solasodin dalam fasa gerak yang digunakan kurang baik (9).

#### Pemisahan Solasodin, AD dan ADD pada Kolom Silika

Jenis eluen yang digunakan untuk kolom silika dipilih dari kumpulan sebelas macam eluen yang dapat memberikan resolusi cukup baik diatas pelat silika (Tabel 1). Mula-mula dipilih campuran n-heksana-butanol-kloroform (5:3:1), karena campuran ini dapat memberikan harga hR<sub>f</sub> yang cukup memadai yaitu 50. Pada Gambar 1 terlihat

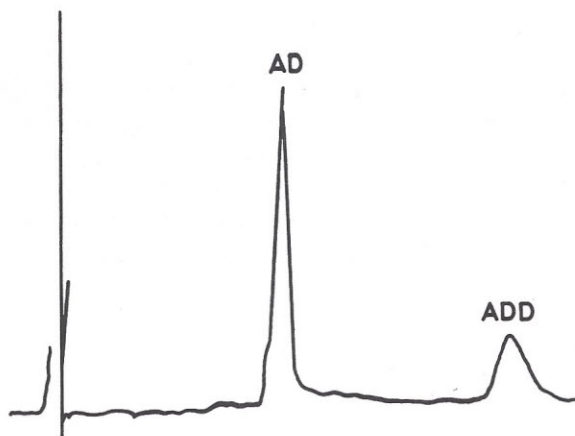


Gambar 1. Eluen: n-heksana-butanol-kloroform (5:3:1).

|                    |             |       |        |
|--------------------|-------------|-------|--------|
| t <sub>0</sub>     | = 3,2 menit | k'AD  | = 0,19 |
| t <sub>r</sub> AD  | = 3,8 menit | k'ADD | = 0,31 |
| t <sub>r</sub> ADD | = 4,2 menit |       |        |

bahwa k' yang dihasilkan terlalu kecil dan resolusi antara kedua puncak kurang baik. Dalam hal ini eluen harus diubah dengan jalan mengusahakan agar kolom silika dapat menahan lebih lama senyawa AD/ADD. Akan tetapi karena tetap diinginkan agar hR<sub>f</sub> solasodine > 50, maka pilihan yang mungkin hanya terbatas pada jenis eluen A, B, C atau E pada Tabel 1. Mengingat bahwa deteksi senyawa solasodin harus dilakukan pada panjang gelombang 205 nm, maka dari keempat pilihan diatas, jenis eluen C yaitu campuran n-heksana dan iso-propanol yang paling aman digunakan karena nilai UV-Cut-Off dari kedua pelarut ini berturut-turut adalah 190 dan 205 nm. Nilai tersebut relatif rendah apabila dibandingkan dengan nilai UV-Cut-Off CCl<sub>4</sub> (265 nm), aseton (330 nm) dan etil asetat (256 nm) yang merupakan salah satu komposisi pelarut dalam eluen jenis A, B dan E. Untuk campuran pelarut heksana-isopropanol ini mula-mula dicobakan perbandingan heksana-iso-propanol (15:1), dengan maksud agar AD/

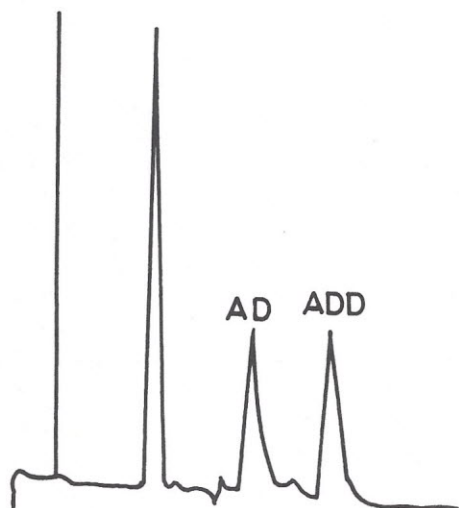
ADD dapat lebih tertahan didalam kolom. Komposisi pelarut ini bersifat relatif tak polar dibandingkan dengan komposisi eluen C. Hasil yang diperoleh tampak pada Gambar 2. Ternyata harga  $k'$  yang dihasilkan terlalu besar



Gambar 2. Eluen: n-heksana-isopropanol (15:1)

|           |               |         |        |
|-----------|---------------|---------|--------|
| $t_0$     | = 3,85 menit  | $k'AD$  | = 2,31 |
| $t_r AD$  | = 12,75 menit | $k'ADD$ | = 4,58 |
| $t_r ADD$ | = 21,50 menit |         |        |

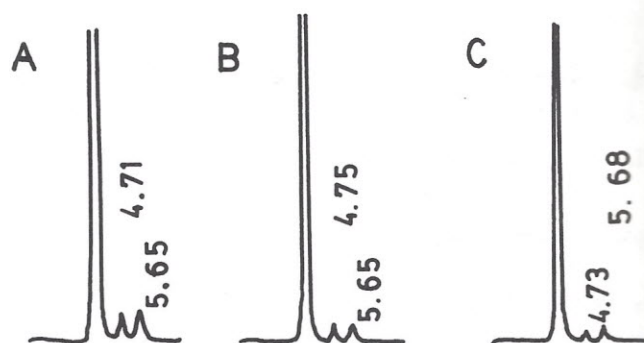
dan jarak kedua puncak sangat jauh. Untuk itu komposisi pelarut perlu diubah menjadi relatif lebih polar, agar kedua puncak masih mempunyai resolusi yang cukup baik, tetapi dengan waktu retensi yang tidak terlalu panjang. Didapatkan komposisi pelarut yang paling optimal adalah n-heksana-isopropanol (85:15), seperti tampak pada Gambar 3. Akan tetapi dengan jenis eluen ini, standar



Gambar 3. Eluen: n-heksana-isopropanol (85:15)

|           |             |         |        |
|-----------|-------------|---------|--------|
| $t_0$     | = 3,5 menit | $k'AD$  | = 1,00 |
| $t_r AD$  | = 7 menit   | $k'ADD$ | = 1,78 |
| $t_r ADD$ | = 9,7 menit |         |        |

solasodin tidak dapat terdeteksi keluar dari kolom, meskipun sudah diusahakan untuk memasang detektor pada panjang gelombang 205 nm. Cara penyelesaian yang terpikirkan adalah dengan memanfaatkan penggunaan kromatografi fasa terbalik. Pada penentuan limit deteksi, komposisi pelarut diubah menjadi heksana-isopropanol (75:25), karena unjuk kerja kolom silika yang digunakan sudah sedikit berubah. Kromatogram yang dihasilkan pada penentuan limit deteksi minimum senyawa AD dan ADD dapat dilihat pada Gambar 4. Terlihat pada kromatogram, dari kiri kekanan, jumlah senyawa AD/ADD yang diinjeksikan semakin kecil dan limit deteksi AD dan ADD yang diperoleh adalah 0,92 ng AD dan 1,54 ng ADD (Gambar 4C).



Gambar 4. Kromatogram pemisahan AD dan ADD yang dihasilkan pada penentuan limit deteksi minimum.

Kolom:Silika.

Eluen:Heksana-Isopropanol (75:25).

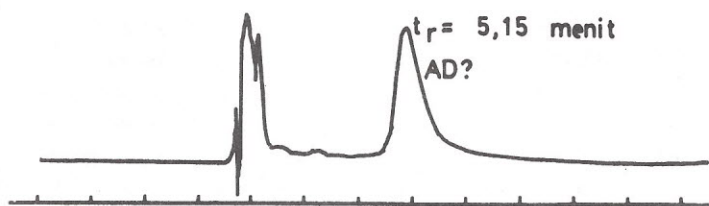
Kecepatan aliran eluen: 1 ml/menit.

Detektor: UV 240 nm. Sensitifitas Detektor: 8

#### Konfirmasi Puncak Menggunakan Detektor Diodearray

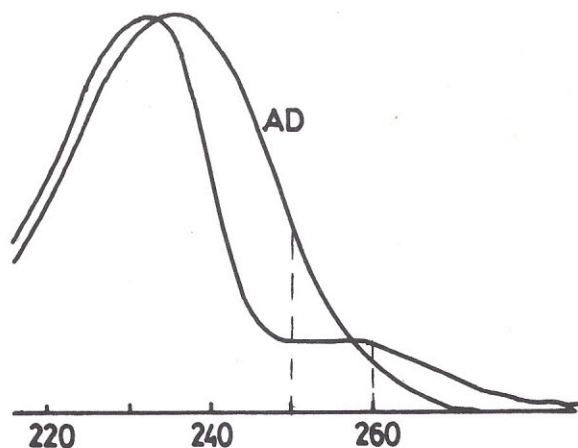
Telah diuraikan diatas, bahwa ternyata untuk kolom silika, campuran heksana-isopropanol (85:15) dapat memberikan hasil yang paling optimal, ditinjau dari segi resolusi, waktu analisa dan nilai *UV-Cut-Off* pelarut. Komposisi pelarut ini kemudian digunakan untuk memantau terbentuknya senyawa AD dan ADD pada satu seri contoh campuran hasil fermentasi, menggunakan detektor *diodearray*. Pada kromatogram standar, AD dan ADD terelusi keluar dari kolom dengan waktu retensi berturut-turut 5,16 dan 6,83 menit.

Pada saat kondisi pemisahan yang sama dipakai untuk menganalisa campuran hasil fermentasi, terlihat dari kromatogram (Gambar 5) adanya puncak dengan  $t_r$  = 5,15 menit, yang diduga merupakan puncak AD ( $t_r AD$  = 5,16 menit). Tetapi kemudian apabila spektrum serapan puncak



Gambar 5: Kromatogram Contoh Campuran Hasil Fermentasi Hari kelima ( $H_5$ ).  
Kolom: Silika.  
Eluen: Heksana-Isopropanol (85:15)  
Detektor: Diodearray  
 $t_r$  AD = 5,16 menit  
 $t_r$  ADD = 6,83 menit

yang diduga AD tadi dihipitkan dengan spektrum serapan standar AD, terlihat perbedaan yang cukup berarti, seperti tampak pada Gambar 6. Dua perbedaan yang nyata

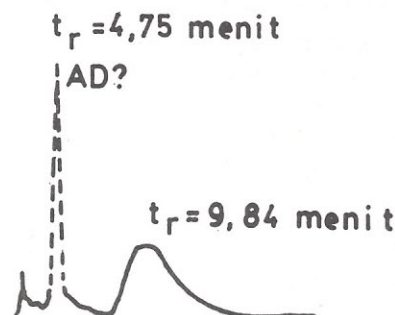


Gambar 6: Spektrum serapan senyawa yang diduga AD dihipitkan dengan spektrum serapan standar AD.

tersebut adalah: (a) panjang gelombang maksimum standar AD adalah 237 nm, sedangkan panjang gelombang maksimum senyawa yang diduga AD adalah 232 nm. (b) apabila perbandingan isyarat detektor pada dua panjang gelombang (250 dan 260 nm) dihitung, maka nilai perbandingan isyarat detektor untuk standar AD akan mempunyai nilai  $\pm 4$  kali lebih besar dari nilai perbandingan isyarat detektor senyawa yang semula diduga sebagai AD. Beberapa kemungkinan dapat terjadi disini, antara lain bahwa: (a) Senyawa yang semula diduga AD adalah senyawa antara (*intermediate*) lain yang sama sekali bukan AD. (b) Senyawa tersebut adalah AD, akan tetapi puncak AD keluar bersamaan dengan puncak senyawa antara yang lain.

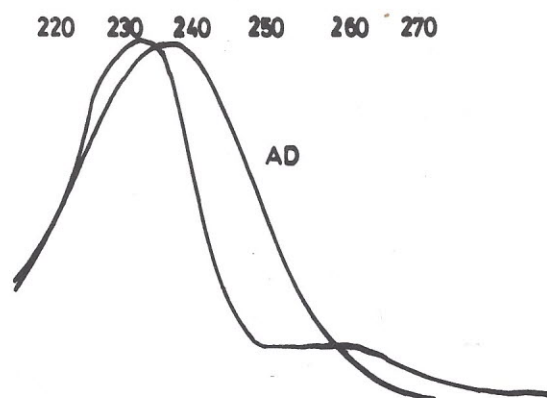
Pada kromatogram contoh campuran hasil fermentasi hari keenam ( $H_6$ ), tampak dua buah puncak dengan  $t_r$

masing-masing 4,75 dan 9,84 menit (Gambar 7). Karena perbedaan  $t_r$  puncak pertama dengan  $t_r$  AD hanya sekitar 24



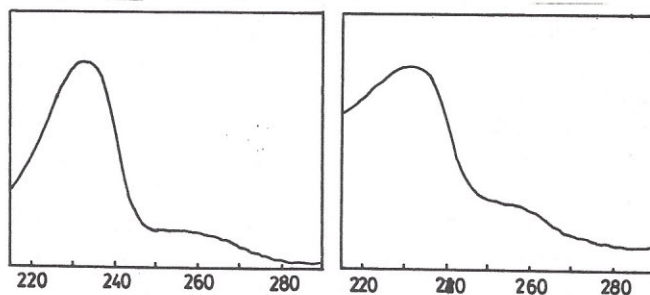
Gambar 7: Kromatogram Contoh Campuran Hasil Fermentasi Hari keenam ( $H_6$ ). Kondisi pemisahan sama dengan kondisi pada Gambar 4.

detik saja, maka puncak yang pertama dikonfirmasi lebih lanjut, melalui bentuk spektrum serapannya (Gambar 8). Ternyata spektrum serapan ini memang sama dengan spektrum serapan puncak yang terdapat pada contoh  $H_5$ , dan berbeda dengan spektrum serapan standar AD.



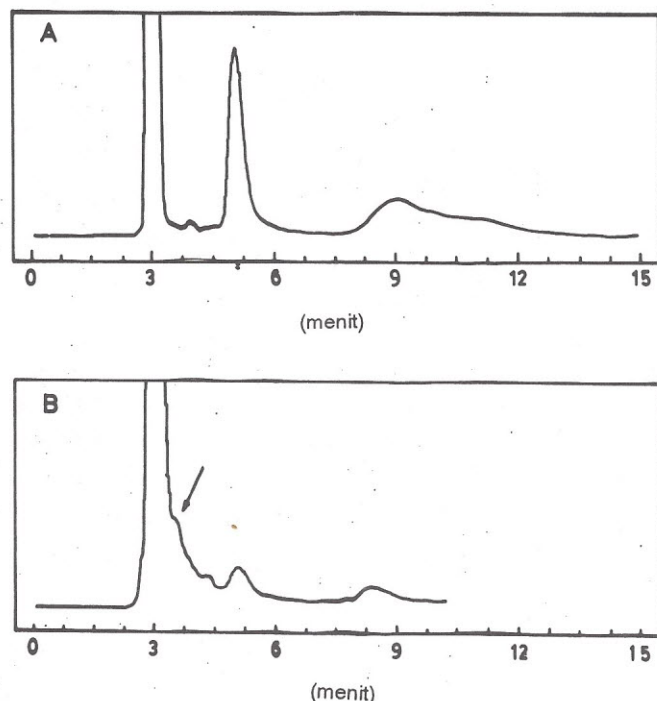
Gambar 8: Spektrum Serapan puncak yang diduga AD dari contoh campuran hasil fermentasi hari keenam ( $H_6$ ) apabila dihipitkan dengan spektrum standar AD.

Pada contoh hasil fermentasi hari kedelapan ( $H_8$ ) dan kesembilan ( $H_9$ ), masih didapatkan puncak dengan  $t_r$  berturut-turut 5,00 dan 5,05 menit, yang mempunyai spektrum serapan sama (Gambar 9) dengan spektrum serapan puncak yang terdapat pada contoh campuran hasil



Gambar 9: Spektrum Serapan puncak yang diduga AD dari contoh campuran hasil fermentasi hari kedelapan ( $H_8$ ) dan kesembilan ( $H_9$ ).

fermentasi sebelumnya ( $H_5$  dan  $H_6$ ). Pada hari fermentasi yang kesembilan, kandungan senyawa dengan  $t_r = \pm 5$  menit mulai berkurang, dan timbul puncak baru dengan  $t_r$  lebih pendek (tanda panah pada Gambar 10B yang tidak nampak pada Gambar 10A).



Gambar 10: Kromatogram contoh campuran hasil fermentasi  
A : Pada Hari kedelapan ( $H_8$ )  
B : Pada Hari kesembilan ( $H_9$ ) Kondisi pemisahan sama dengan Gambar 4.

#### Pemisahan Solasodin, AD dan ADD pada Kolom $C_{18}$

Metanol yang pada pelat  $C_{18}$  dapat memisahkan AD dan ADD, ternyata pada saat dipakai sebagai eluen untuk kolom  $C_{18}$  tidak dapat memberikan resolusi pemisahan yang cukup baik untuk kedua senyawa tersebut. Untuk itu kemudian pelarut dimodifikasi menjadi Metanol-Air (65:35). Dengan campuran pelarut ini AD dan ADD terpisah dengan baik, akan tetapi solasodin tertahan total dalam kolom.

Usaha selanjutnya untuk memodifikasi kondisi kromatografi dilakukan dengan memperhatikan hal-hal berikut ini: (a) Komposisi metanol-air diubah dengan jenis pelarut lain yang mempunyai daya elusi relatif lebih kuat, sedemikian sehingga solasodin dapat terelusi keluar dari kolom, akan tetapi puncak AD dan ADD masih dapat terpisah dengan resolusi yang cukup memadai. (b) Jenis pelarut yang akan dipilih hendaknya mempunyai nilai *UV-Cut-Off* relatif rendah mengingat deteksi solasodin harus dilakukan pada panjang gelombang relatif rendah (205 nm)

Pada Tabel 2 terlihat bahwa apabila dibandingkan terhadap eluen A, penambahan asetonitril ke dalam metanol (eluen B) menghasilkan daya elusi yang lebih kuat. Hal ini

dapat terlihat dari nilai  $hR_f$  solasodin (62) yang relatif besar. Dengan metanol (eluen A) hanya dihasilkan  $hR_f$  sebesar 36. Apabila dikaitkan dengan persyaratan pada butir b, maka asetonitril merupakan pilihan yang tepat karena merupakan pelarut yang paling aman untuk digunakan pada panjang gelombang pengukuran yang relatif rendah. Akan tetapi hasil percobaan menunjukkan bahwa dengan menggunakan hanya asetonitril sebagai eluen, solasodin masih belum dapat terelusi keluar dari kolom.

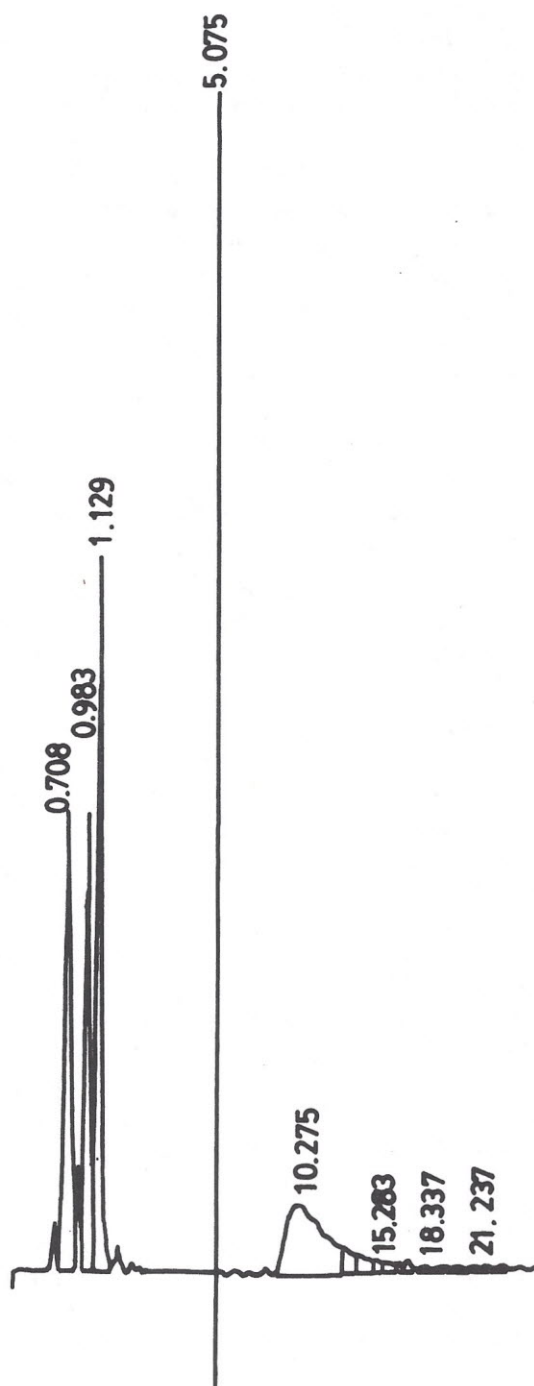
Crabbe dan Fryer (10) menguraikan beberapa sifat solasodin. Senyawa ini bersifat relatif tak polar, tidak larut dalam air, tetapi larut dalam alkohol dan beberapa pelarut non polar seperti kloroform dan benzen. Lebih lanjut diuraikan bahwa solasodin merupakan senyawa yang bersifat basa lemah, yang dalam media yang bersifat sedikit asam, akan mudah membentuk ion. Untuk mencegah terjadinya bentuk ion, dianjurkan untuk menggunakan larutan buffer sebagai salah satu komponen fasa gerak dan menjaga pH eluen didaerah basa. Menambahkan garam kedalam fasa gerak dapat pula memberikan efek *salting in*, yang menyebabkan kelarutan dari senyawa dalam fasa gerak bertambah besar.

Dengan menggunakan bufer tris 0,01 M sebagai salah satu komponen dalam fasa gerak, puncak solasodin dapat terelusi dan terdeteksi pada panjang gelombang 205 nm. Hanya saja waktu retensi yang dihasilkan masih terlalu besar, sehingga bentuk puncaknya kurang baik, berupa puncak yang berekor. Apabila konsentrasi bufer tris diperbesar, dapat dihasilkan waktu retensi solasodin yang makin kecil seperti terlihat pada Tabel 3. Makin kecil waktu retensi solasodin, bentuk puncak yang dihasilkan juga makin baik.

Tabel 3. Pemisahan Solasodin, AD dan ADD pada Kolom  $C_{18}$ .

| Jenis dan Komposisi Pelarut                         | $t_r$ (menit) |      |           |
|-----------------------------------------------------|---------------|------|-----------|
|                                                     | ADD           | AD   | Solasodin |
| A. Asetonitril-larutan bufer tris 0,01 M<br>70 : 30 | 1,15          | 1,39 | 19,68     |
| B. Asetonitril-larutan bufer tris 0,02 M<br>70 : 30 | 1,13          | 1,34 | 13,14     |
| C. Asetonitril-larutan bufer tris 0,03 M<br>80 : 20 | 0,98          | 1,13 | 10,28     |

Dengan kondisi eluen yang terakhir, yaitu campuran asetonitril-larutan bufer tris 0,03 M (80:20), masih dihasilkan puncak yang sedikit berekor (Gambar 11). Tampaknya apabila konsentrasi garam dalam larutan bufer makin diperbesar, ekor dari puncak solasodin dapat menghilang. Akan tetapi hal ini tidak dilakukan karena dikhawatirkan konsentrasi larutan garam yang relatif tinggi akan menyebabkan sebagian garam mengendap dalam kolom dan dapat merusak paking dari kolom tersebut.



Gambar 11: Kromatogram contoh hasil fermentasi.  
 Kolom:  $C_{18}$   
 Eluen: Asetonitril-larutan bufer tris 0,03 M (80:20)  
 Kecepatan aliran eluen: 4 ml/menit  
 Detektor UV: 240 dan 205 nm  
 $t_r$  ADD = 0,98 menit  
 $t_r$  AD = 1,13 menit  
 $t_r$  solasodin = 10,28 menit

Akan lebih aman apabila usaha untuk menghilangkan ekor puncak solasodin ditempuh dengan jalan memperbesar kandungan asetonitril dalam eluen. Telah dicobakan

komposisi pelarut asetonitril-larutan bufer tris 0,03 M (90:10) sebagai eluen. Dengan komposisi pelarut ini,  $t_r$  solasodin berubah cukup besar, menjadi hanya 6,22 menit. Akan tetapi resolusi pemisahan AD dan ADD menjadi kurang baik. Selanjutnya dilakukan elusi gradien yaitu pada awal elusi digunakan kandungan asetonitril yang relatif rendah, agar AD dan ADD masih dapat mempunyai resolusi yang cukup baik, sedangkan pada akhir elusi diusahakan agar kandungan asetonitril makin besar agar solasodin dapat terelusi dengan  $t_r$  relatif kecil dan bentuk puncak relatif sempurna. Kemungkinan melakukan elusi gradien ini tidak memberikan harapan, karena kestabilan garis dasar (*base line*) pada panjang gelombang pengukuran yang relatif rendah (205-240 nm) sangat sulit tercapai.

## KESIMPULAN

Telah diperoleh beberapa macam kondisi pemisahan solasodin, AD dan ADD pada pelat silika. Ditemukan kendala mengenai proses elusi dan deteksi solasodin pada kolom silika. Solasodin ditahan relatif kuat pada kolom silika dan belum berhasil dideteksi keluar dari kolom. Oleh sebab itu dicoba dikembangkan pemisahan solasodin, AD dan ADD pada kromatografi fasa terbalik. Telah didapatkan 4 macam komposisi pelarut yang dapat memisahkan solasodin, AD dan ADD pada pelat  $C_{18}$ . Solasodin telah pula berhasil dielusi keluar dari kolom  $C_{18}$  menggunakan campuran asetonitril-larutan bufer tris 0,03 M (80:20) sebagai eluen, meskipun bentuk puncak yang dihasilkan belum terlalu sempurna.

Detektor *diodearray* dapat digunakan untuk mengkonfirmasi puncak-puncak yang terbentuk dalam campuran hasil biokonversi solasodin. Dari hasil konfirmasi puncak menggunakan detektor *diodearray*, dapat diketahui bahwa puncak senyawa yang terelusi keluar pada  $t_r$  yang sama dengan  $t_r$  AD, ternyata bukan senyawa AD. Untuk mengkonfirmasi puncak senyawa tersebut, akan dijajagi kemungkinan penggunaan kromatografi preparatif.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian dana penelitian ini diperoleh dari Proyek Bioteknologi AAECF Phase II, tahun 1990 - 1992. Pada penelitian ini telah digunakan pula peralatan HPLC dengan panjang gelombang pengukuran yang dapat diprogram dari PAU-Bioteknologi ITB. Untuk dapat memulai penelitian ini lebih awal, diperoleh standar AD/ADD dari Bapak Dr Triadi Basuki, Puslitbang Bioteknologi-LIPI-Bogor dan standar solasodin dari Bapak Kresna S.A. dan Ibu Arini, P.T. Kimia Farma, Bandung. Makalah dapat disampaikan pada Seminar Nasional X Perhimpunan, Biokimia Indonesia, Ujung Pandang 3-4 Juli 1992 atas fasilitas yang diberikan oleh P3KT-LIPI.

## PUSTAKA

1. F. Geiss, H. Schlitt, Thin-Layer Chromatography as a Pilot Technique for Rapid Column Chromatography (Summary), *J. Chromatogr.*, 82: 5 (1973).
2. E. Soczewinski, T. Dzido, W. Golkiewicz, Comparison of High Performance Liquid Chromatographic and Thin-Layer Chromatographic Data Obtained with Various Types of Silica, *J. Chromatogr.*, 131: 408-411 (1977).
3. S. Hara, Use of Thin-Layer Chromatographic Systems in High Performance Liquid Chromatographic Separations. Procedure for Systematization and Design of the Separation Process in Synthetic Chemistry, *J. Chromatogr.*, 137: 41-52 (1977).
4. E. Soczewinski, T. Wawrzynowicz, Thin-Layer Chromatography as a Pilot Technique for the Optimization of Preparative Column Chromatography, *J. Chromatogr.*, 218: 729-732 (1981).
5. W. Jost, H.E. Hauck, F. Eisenbeiß, Thin-Layer Chromatography as a Pilot Technique for Transferring Retention Data to HPLC, *Kontakte (Darmstadt)* 3: 45 (1984).
6. J. Kantasubrata, Loyniwati, Jamilah, Pemisahan Solasodin, 4-Androstene-3,17-dione (AD) dan 1,4-Androstadiene-3,17-dione (ADD) menggunakan kromatografi fasa normal dan kromatografi fasa terbalik, laporan intern Proyek Bioteknologi AAEC, Oktober 1991.
7. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons Inc., New York, (1980), hal 592.
8. Separation of Solasodine, AD and ADD by the use of normal and reversed phases chromatography; Bioconversion of solasodine by *Mycobacterium phlei* DSM 43286, A Progress Report Submitted to "Sixth Subcommittee Conference on ASEAN-Australia Biotechnology Project", January 1992, Manila, The Philippines.
9. Melander W., Stoveken, J., Horvath, C., Stationary Phase Effects in Reversed-Phase Chromatography, *J. Chromatogr.*, 199: 35-56 (1980).
10. P.G. Crabbe, C. Fryer, Rapid Quantitative Analysis of Solasodine, Solasodine Glycosides and Solasodine by High-Pressure Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, 187: 101-109 (1980).

Serba-serbi ..... Sambungan dari hal 52

setiap tahun dengan harga hampir sama dengan zat-zat kimia curah. Produksi ini kemudian diikuti dengan produksi senyawa-senyawa penguat cita rasa lain seperti asam aspartat dan nukleotida, dan asam-asam amino esensial seperti lisin sebagai tambahan makanan ternak. Bangsa Jepang telah menanamkan modal yang besar untuk penelitian dan pengembangan fermentasi asam amino hingga mereka diakui sebagai pelopor dalam bidang ini.

Harga minyak pada dekade 1950 dan 1960 merupakan faktor pendorong penelitian industri ke arah produksi protein sel tunggal (SCP, Single Cell Protein), dengan penekanannya pada hasil-hasil minyak bumi, khususnya metan dan metanol. Banyak proyek besar dimulai, pada umumnya oleh perusahaan minyak dan kimia multinasional, namun hanya sedikit yang mencapai tingkat produksi. Berbagai kendala dihadapi, misalnya perasaan takut akan residu hidrokarbon yang berbahaya yang dapat terbawa pada hasil SCP, atau kurangnya air pendingin yang cukup di tempat yang tepat seperti Timur Tengah. Naiknya harga minyak pada 1973/74 tidak memungkinkan negara-negara maju menjalankan roda perekonomian yang sangat bergantung pada harga bahan baku. Di Inggris, ICI dan Rank Hovis Mc Dougall melanjutkan proyek ini untuk menghasilkan bahan pakan dan pangan meskipun masa depannya masih kurang jelas.

Beberapa hasil fermentasi mempunyai pasar meskipun kecil, misalnya *Bacillus thuringiensis* suatu bioinsektisida yang efektif terhadap beberapa pes, dan gam xantan yang merupakan suatu zat pengemulsi, pengental dan penstabil yang baik. Namun demikian secara umum pengembangan hasil proses biologi tersebut belum terlihat. Sejarah mem-

buktikan bahwa proses kimia masih tetap dominan, khususnya pada produksi etanol serta berbagai pelarut lain, beberapa asam organik dan vitamin. Daya tarik bioteknologi sekarang ini banyak didasari oleh harapan teknologi dari pada keberhasilan sejarah.

Pada dekade tahun 1970 terjadi tiga peristiwa penting yang sangat berpengaruh pada perkembangan bioteknologi. Pada akhir 1973 dan 1974, sebagai akibat perang Yom Kippur harga minyak mentah menjadi empat kali lipat. Pada tahun 1973 itu juga Stanley Cohen dan Herbert Boyer menunjukkan bahwa melalui penggunaan gabungan enzim endonuklease dan ligase, DNA dapat dipotong dan disambung kembali dengan susunan yang baru. Kendala yang disebabkan karena galur yang mempunyai sifat genetika terbatas dapat diatasi dengan teknik *in vitro*. Pada 1975 Georges Kohler dan Cesar Milstein menunjukkan produksi antibodi monoklonal dari fusi sel-sel limfosit dan tumor myeloma.

Kenaikan harga minyak amat menggetarkan ekonomi Barat. Negara-negara penghasil minyak jelas lebih beruntung dibandingkan dengan negara-negara industri dan tidak akan membiarkan sumber-minyak mereka habis dengan cepat untuk menyediakan minyak bagi dunia dengan harga murah. Reaksi awal dari negara-negara Barat adalah menunjang secara finansial pengembangan berbagai panel pemanas surya, kincir angin dan kendaraan dengan bahan bakar kotoran ayam. Banyak negara, khususnya Amerika Serikat secara perlahan-lahan dan tenang meningkatkan program pemerintah untuk pengembangan sumber energi alternatif, termasuk di dalamnya adalah proses pencernaan anaerobik, produksi etanol secara fermentasi,

Bersambung ke hal. 72