

Studi Kromatografi Lapis Tipis Preparatif pada Pelat Silika dan Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi pada Kolom C₁₈ dari Senyawa-Senyawa Hasil Biokonversi Solasodine

J. Kantasubrata^{*)}, T.Y. Fitri^{**)}, V.A. Halomoan^{**)},
Buchori^{**)}, dan A.T.Karossi^{*)}

^{*)} Puslitbang Kimia Terapan - LIPI, Jalan Cisitu, Bandung 40135

^{**)} Departemen Kimia - ITB, Jalan Ganesha 10, Bandung 40132

INTISARI

Pemisahan campuran hasil biokonversi solasodin oleh *Mycobacterium phlei* DSM 43286 telah dilakukan pada kromatografi preparatif lapis tipis (KLT preparatif) di atas pelat silika, menggunakan campuran kloroform-etanol (48:1) sebagai eluen. Pemeriksaan kembali secara kromatografi telah pula dilakukan terhadap senyawa-senyawa yang berhasil dipisahkan dengan KLT preparatif ini. Selain menggunakan fasa diam silika, telah diuji pula pemisahan campuran hasil biokonversi menggunakan fasa diam C₁₈. Standar solanesol dan enam macam derivat androstan atau androsten dapat dipisahkan dengan baik pada pelat C₁₈ menggunakan eluen metanol-kloroform (4:1). Untuk pemisahan Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (KCKT) pada kolom C₁₈ telah digunakan campuran pelarut metanol-air, karena dengan campuran pelarut metanol-kloroform seperti tersebut diatas, senyawa yang akan dipisahkan keluar bersamaan dengan puncak pelarut. Resolusi pemisahan yang optimal dari hasil biokonversi solasodin baru dapat dicapai apabila digunakan teknik elusi gradien menggunakan campuran pelarut metanol-air.

ABSTRACT

The separation of solasodine bioconversion products after fermentation with *Mycobacterium phlei* DSM 43286 has been carried out, using preparative thin layer chromatography on silica plate with chloroform-ethanol (48:1) mixture as an eluent. Chromatographic cross check of the compound being separated has also been done. In addition to the silica stationary phase, the separation of bioconversion products using C₁₈ has also been explored. Solanesol and six derivatives of androstane or androstene standards could be well separated on C₁₈ plate using methanol-chloroform (4:1). For the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation on C₁₈ column, the mixture of methanol-water was used instead of methanol-chloroform, since with the latter eluent, compounds being separated were eluted together with the solvent peak. The optimum resolution of solasodine bioconversion products could only be attained when the gradient elution technique using the mixture of methanol-water was used.

PENDAHULUAN

Proses biokonversi solasodin oleh *Mycobacterium phlei* DSM 43286 dilakukan dalam upaya mendapatkan senyawa antara seperti AD (4-androstene-3,17-dione) dan ADD (1,4-androsta-diene-3,17-dione) yang merupakan prekursor pada pembuatan obat antifertilitas (1). Untuk dapat memantau terbentuknya senyawa hasil biokonversi, dibutuhkan suatu metoda yang dapat memisahkan dan mendeteksi substrat dari senyawa yang terbentuk pada proses tersebut. Dalam hal ini metoda kromatografi merupakan pilihan yang paling tepat.

Dari hasil tinjauan pustaka yang telah dilakukan sebelumnya, tidak ditemukan adanya metoda pemisahan KLT dan KCKT untuk senyawa solasodin, AD dan ADD. Oleh sebab itu pada penelitian ini dicoba untuk mengembangkan suatu metoda pemisahan tersebut menggunakan kromatografi fasa normal (KFN) dan kromatografi fasa terbalik (KFT) (2,3).

Pada penelitian tahap pertama, telah dilaporkan hasil pemisahan pada KFN (4,5), menggunakan fasa diam silika dalam kombinasinya dengan beberapa jenis campuran pelarut sebagai fasa gerak, diantaranya campuran pelarut heksana-isopropanol (85:15) dan kloroform-etanol (48:1). Karena campuran pelarut diatas dianggap dapat memberikan hasil yang paling optimal, ditinjau dari segi resolusi pemisahan, waktu analisa dan nilai *UV-Cut-Off* pelarut (2), maka kedua campuran pelarut tersebut pernah digunakan untuk memantau terbentuknya senyawa AD dan ADD dari satu seri contoh campuran hasil biokonversi.

Pada kromatogram contoh campuran hasil biokonversi dari studi terdahulu (2), terlihat adanya puncak yang mempunyai waktu retensi sama dengan standar AD. Dalam usaha mengkonfirmasi puncak tersebut, telah digunakan detektor *diodearray*. Tetapi ternyata hasil konfirmasi puncak masih menunjukkan adanya perbedaan antara spektrum serapan puncak yang diduga AD dengan spektrum serapan standar AD. Dengan demikian besar kemungkinan bahwa senyawa hasil biokonversi yang semula diduga AD adalah senyawa antara (*intermediate*) yang dapat berupa salah satu derivat AD atau suatu senyawa lain yang sama sekali bukan senyawa AD atau derivatnya.

Untuk dapat menjawab kemungkinan ini, telah diusahakan suatu pendekatan dengan jalan melakukan pemisahan dari 8 macam derivat senyawa solasodin, androstan dan androsten, menggunakan campuran pelarut yang umum dipakai untuk pemisahan steroid (5-11). Pada penelitian tahap kedua, telah dilaporkan hasil pemisahan KFN dari ke-8 campuran senyawa standar tersebut (3), sedangkan dalam penelitian ini akan dibahas hasil pemisahannya pada KFT.

Sama halnya seperti pada KFN, pada KFT pemisahan mula-mula dilakukan di atas pelat kromatografi lapis tipis (KLT). Kondisi pemisahan KLT yang memberikan hasil cukup baik ditransposisikan pada kromatografi cairan kinerja tinggi (KCKT) dan selanjutnya dapat dipakai untuk menganalisa campuran hasil biokonversi guna mendeteksi terbentuknya senyawa yang kemungkinan mempunyai retensi sama dengan salah satu dari ke-8 standar di atas.

Selain itu agar senyawa-senyawa hasil biokonversi yang terbentuk dapat diidentifikasi secara tepat, dilakukan kromatografi preparatif dari campuran hasil biokonversi. Senyawa tersebut dapat dipisahkan melalui KLT preparatif atau KCKT dalam skala semi preparatif. Untuk dapat bekerja dalam skala preparatif atau semi preparatif, perlu dicari terlebih dahulu kondisi pemisahan campuran senyawa hasil biokonversi dalam skala analitik. Kondisi yang diperoleh dapat diaplikasikan kemudian untuk pemisahan dalam skala yang lebih besar.

Dari hasil-hasil pemisahan sebelumnya, diperoleh data bahwa pola pemisahan dari campuran hasil biokonversi cukup menyebar karena kepolaran dari senyawa-senyawa yang terbentuk dalam campuran tersebut sangat bervariasi. Di atas suatu pelat KLT, hal ini tidak akan menimbulkan masalah yang cukup berarti, tetapi tidak demikian halnya untuk KCKT. Pada kolom KCKT, perbedaan kepolaran yang relatif besar dari senyawa yang akan dipisahkan menyebabkan proses elusi harus dilakukan secara gradien.

BAHAN DAN METODA

Bahan yang digunakan

Standar Solasodin, Solanesol, 4-androsten-3,17-dion (AD), 1,4-androsta-dien-3,17-dion (ADD), 1,4,9,(11)-androstatrien-3,17-dion, 5 α -androstan-3 β ,11 β ,17 β -triol, 5 α -androstan-3,17-dion, dan 5-androsten-3 β ,17 β -diol dibeli dari SIGMA. Pelat/kolom analitik yang dipakai adalah pelat Silika GF₂₅₄ (EM 5554), pelat RP-18F₂₅₄ (EM 5553), kolom Lichrosorb Si60 (5 μ m) (EM 50388) dan kolom μ -Bondapak C₁₈, WATERS. Pelarut yang digunakan sebagai komposisi eluen diperoleh dari E.MERCK dan larutan bufer tris dibuat dengan melarutkan sejumlah tris (hidroksimetil) 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

Peralatan KLT terdiri dari alat pembuat lapisan tipis (spreader), pipa kapiler, templet, bejana kromatografi, alat penyemprot, lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Satu unit peralatan KCKT WATERS ALC/GPC 244 terdiri dari: Pompa, Pengatur Elusi Gradien, Detektor UV dan Rekorder. Satu unit peralatan KCKT SHIMADZU LC 6A lengkap dengan detektor *spectrodiode-array* SPD M6A, Komputer IBM dan Printer P 5300.

Persiapan Contoh

Contoh campuran hasil fermentasi mula-mula dipisahkan dari biomassa/selnya dengan sentrifugasi, kemudian filtratnya diekstraksi dengan kloroform sebanyak 3 kali, setiap kali dengan setengah volum cairan media. Lapisan kloroform dikumpulkan, dicuci dengan larutan asam oksalat 2%. Kelebihan asam oksalat dicuci dengan air. Ekstrak kloroform yang diperoleh dikeringkan dengan Na₂SO₄ anhidrat, kemudian dievaporasi hingga kering dan dilarutkan kembali dalam metanol atau kloroform, disesuaikan dengan eluen yang digunakan.

Pemisahan Campuran Hasil Biokonversi menggunakan Kromatografi Preparatif Lapis Tipis

Untuk keperluan kromatografi preparatif, disiapkan pelat berukuran 20 x 20 cm dengan cara sebagai berikut: ditimbang 50 gr silika gel 60 yang mengandung indikator fluoresensi dan dilarutkan dalam 110 ml aquadest. Campuran yang terbentuk dituangkan ke dalam alat pembuat lapisan tipis dan ditebarkan di atas beberapa pelat gelas berukuran 20 x 20 cm, dengan ketebalan 0,5 mm. Untuk melihat unjuk kerja pelat preparatif buatan laboratorium, maka kondisi pemisahan senyawa-senyawa standar yang diperoleh pada pelat analitik (3) dicobakan terlebih dahulu di atas pelat preparatif.

Pelat hasil elusi mula-mula dilihat di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm. Senyawa AD, ADD dan 1,4,9,(11)-androstatriene-3,17-dione akan tampak sebagai noda berwarna ungu. Senyawa lainnya tidak dapat terdeteksi dengan cara ini sehingga untuk mendeteksinya, pelat disemprot dengan pereaksi asam sulfat 50% dalam etanol, yang disiapkan dengan menambahkan 5 ml H₂SO₄ pekat tetes demi tetes kedalam 5 ml etanol. Campuran ini kemudian didinginkan dan disemprotkan pada pelat yang kemudian dipanaskan dalam oven 80°C selama 10 menit. Seluruh senyawa akan tampak sebagai noda dengan berbagai macam warna.

Sebelum dilakukan pemisahan di atas pelat preparatif, beberapa contoh campuran hasil biokonversi dari waktu fermentasi yang berbeda-beda ditotolkan berdampingan dalam suatu pelat analitik. Contoh hasil biokonversi dengan pola pemisahan hampir sama dikumpulkan menjadi satu.

Kemudian dengan menggunakan kondisi pemisahan yang sama, campuran contoh di atas dicoba dipisahkan di atas pelat preparatif. Sebagai eluen digunakan 2 macam campuran pelarut yaitu campuran kloroform-etanol (48:1) dan campuran CCl₄-butanol (15:2). Campuran pelarut yang pertama dipilih karena merupakan eluen yang dapat memisahkan cukup baik solasodin, solanesol dan 6 macam derivat androstan atau androsten di atas pelat analitik, sedangkan campuran pelarut yang kedua dipilih karena merupakan eluen yang dapat memberikan resolusi pemisahan paling baik untuk contoh hasil biokonversi. Noda yang terdeteksi cukup jelas di bawah lampu UV 254 nm, dikumpulkan secara terpisah, diekstraksi menggunakan pelarut kloroform, disaring dan pelarutnya diuapkan kembali menggunakan *rotary evaporator*.

Senyawa yang berhasil dipisahkan dicoba ditotolkan kembali di atas pelat analitik untuk mengkonfirmasi bahwa memang senyawa hasil pemisahan tersebut hanya terdiri dari satu noda. Untuk itu dicobakan beberapa jenis eluen dengan kepolaran yang berbeda. Jenis eluen dipilih dari kumpulan sebelas macam eluen yang pernah dilaporkan dapat memisahkan solasodin, AD dan ADD dengan baik (2).

Pemisahan Solasodin, Solanesol dan Derivat Senyawa Androstan atau Androsten pada Pelat dan Kolom C₁₈.

Pada pemisahan ini digunakan pelat RP-18F₂₅₄ yang mengandung indikator fluoresensi. Penotolan dilakukan di atas pelat menggunakan pipa kapiler.

Komposisi pelarut yang optimal, dicari dengan jalan memodifikasi campuran pelarut yang dapat memisahkan cukup baik solasodin, AD dan ADD, yang pernah diperoleh pada pekerjaan terdahulu (1). Apabila harga hR_f yang diperoleh belum cukup memadai, maka dilakukan modifikasi jenis dan komposisi pelarut, didasarkan pada deret eluotropik pelarut. Elusi dilakukan dalam bejana kromatografi dengan jarak elusi 7 cm.

Kondisi pemisahan yang diperoleh pada pelat KLT kemudian dipakai untuk kolom KCKT. Pada pemisahan KCKT kecepatan aliran eluen diatur 1 mL/menit, deteksi dilakukan dengan detektor UV pada panjang gelombang 254 nm dan kecepatan kertas pada rekorder 1 cm/menit. Dengan menggunakan detektor *diodearray* dibuat spektrum serapan dari senyawa standar di atas, agar apabila diperlukan dapat dibandingkan dengan spektrum dari satu atau lebih puncak pada kromatogram larutan contoh, yang mempunyai waktu retensi sama dengan senyawa standar tersebut.

Pemisahan Campuran Hasil Biokonversi pada Kolom C₁₈ menggunakan Elusi Gradien.

Dalam upaya mencari kondisi elusi yang optimal untuk kolom KCKT, dicoba melakukan elusi gradien menggunakan campuran pelarut metanol dan air. Pada elusi

gradien ini, kecepatan aliran eluen diatur 1 mL/menit dan deteksi dilakukan dengan detektor UV pada panjang gelombang 254 nm. Kondisi elusi yang optimal ditetapkan berdasarkan pola pemisahan puncak-puncak hasil biokonversi yang paling ideal dan kondisi tersebut diaplikasikan kemudian pada beberapa contoh hasil biokonversi dengan waktu fermentasi yang berbeda.

HASIL DAN DISKUSI

Pemisahan Campuran Hasil Biokonversi menggunakan Kromatografi Preparatif Lapis Tipis

Dari hasil percobaan sebelumnya, telah dilaporkan bahwa delapan senyawa derivat solasodin dan derivat androstan atau androsten dapat dipisahkan dengan baik pada pelat silika skala analitik menggunakan campuran kloroform-etanol (48:1) sebagai eluen (3). Pelat preparatif buatan laboratorium telah diuji unjuk-kerjanya terhadap pemisahan delapan macam standar ini, Resolusi pemisahan yang diperoleh ternyata cukup baik, hampir menyamai hasil pemisahan di atas pelat analitik seperti ditunjukkan pada Tabel 1.

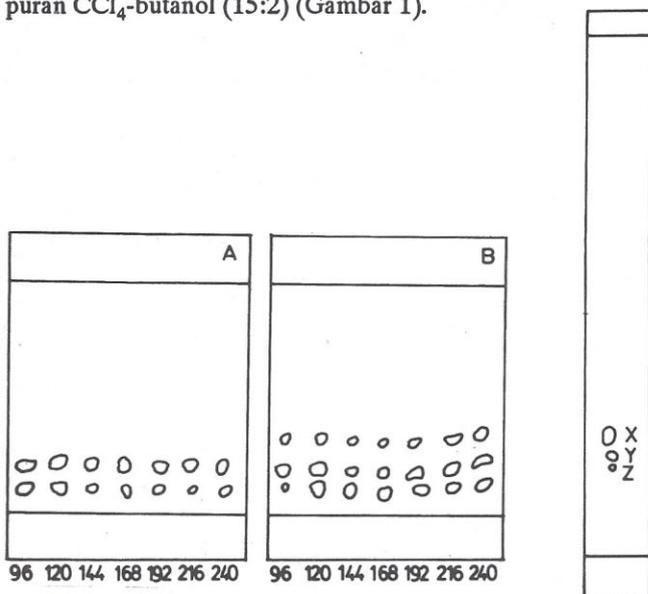
Tabel 1: Perbandingan Nilai hR_f dari Solasodin, Solanesol dan Derivat Senyawa Androstan atau Androsten pada Pelat Analitik Siap Pakai (MERCK 5554) dan Pelat Preparatif Buatan Laboratorium

No-da	Nama Senyawa	hR _f noda pada pelat	
		Analitik Preparatif	
1	5 α -androstan-3 β , 11 β , 17 β -triol	10	7
2	Solasodin	29	20
3	5-androsten-3 β , 17 β -diol	37	26
4	1,4-androsta-dien-3, 17-dion (ADD)	46	38
5	1, 4, 9, (11)-androstatrien-3, 17-dion	60	45
6	4-androsten-3, 17-dion (AD)	66	54
7	5 α -androstan-3, 17-dion	80	75
8	Solanesol	94	84

Data ini memberikan dukungan bahwasanya apabila memang akan dilakukan kromatografi preparatif, pelat yang disiapkan di laboratorium ini akan dapat digunakan dalam kombinasinya dengan jenis eluen yang memberikan resolusi pemisahan cukup baik pada pelat analitik.

Untuk melihat kesamaan dan perbedaan hasil yang diperoleh dari contoh-contoh dengan waktu fermentasi yang berbeda, maka sebelum dilakukan kromatografi preparatif, contoh campuran hasil biokonversi ditotolkan terlebih dahulu di atas pelat analitik.

Dengan membandingkan pola pemisahan yang diperoleh dari satu contoh hasil fermentasi yang sama, dapat terlihat bahwa campuran kloroform-etanol (48:1) dapat memberikan pemisahan yang relatif lebih baik dari campuran CCl₄-butanol (15:2) (Gambar 1).



Gambar 1: Pemisahan contoh campuran hasil biokonversi pada pelat silika. Deteksi noda dilakukan di bawah lampu UV 254 nm.

A: menggunakan CCl₄ - Butanol (15:2)
B: menggunakan kloroform - etanol (48:1)

Gambar 2: Pemisahan contoh campuran hasil biokonversi pada pelat preparatif.

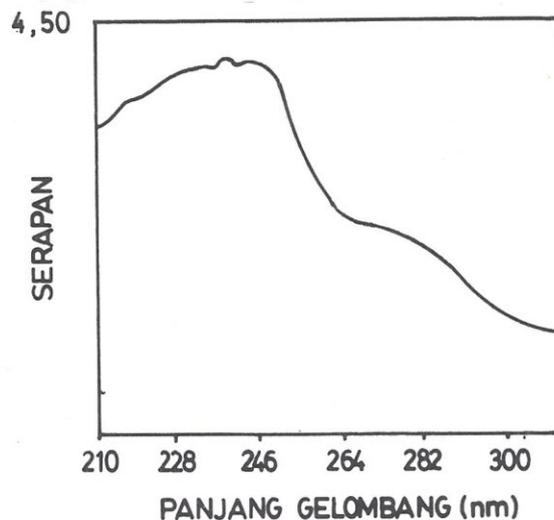
Untuk itu campuran kloroform-etanol (48:1) ini yang selanjutnya digunakan pada pengerjaan preparatif. Di atas pelat preparatif buatan laboratorium, pola pemisahan yang diberikan menjadi sedikit berbeda seperti tampak pada Gambar 2.

Karena jumlah senyawa Y dan Z (Gambar 2) relatif kecil, maka hanya noda X yang diidentifikasi lebih lanjut. Kemurnian senyawa diperiksa pada pelat silika KLT, menggunakan 4 komposisi pelarut yang berbeda sebagai eluen. Keempat komposisi pelarut tersebut terdiri dari eluen yang digunakan sebelumnya untuk mengelusi pelat preparatif dan tiga lainnya dipilih dari kumpulan sebelas pelarut yang memisahkan dengan baik solasodin, AD dan ADD (1,2), yang diperkirakan dapat memberikan nilai hR_f kecil, sedang dan relatif besar. Hasil pemisahan yang diperoleh ditunjukkan pada Tabel 2 dan dari hasil pemeriksaan ini memang hanya diperoleh satu noda.

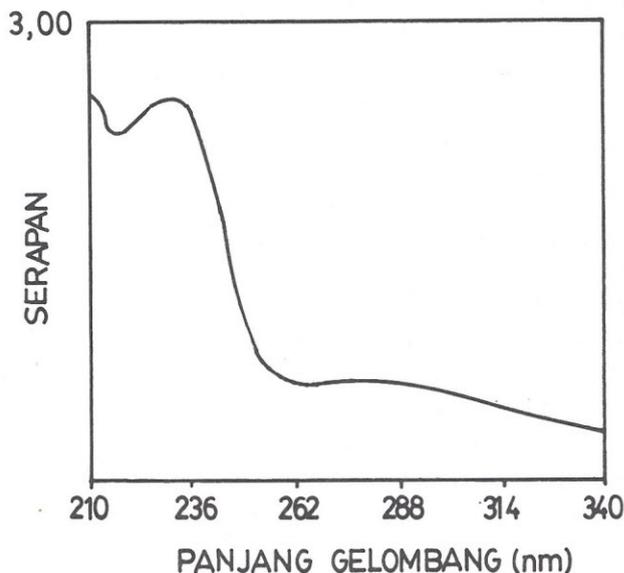
Tabel 2. Pemeriksaan Kemurnian Senyawa X Hasil Kromatografi Preparatif (pada pelat preparatif dengan eluen kloroform-etanol = 48:1, hR_f noda senyawa X ini = 22).

Jenis dan Komposisi Pelarut	hR _f
A. CCl ₄ -Butanol 15 : 2	16
B. CCl ₄ -Etilasetat-Metanol 10 : 2 : 1	36
C. CCl ₄ -2-Propanol 7 : 1	33
D. n-Heksana-Aseton 47 : 53	83

Spektrum serapan UV dari senyawa X diberikan pada Gambar 3 dan apabila spektrum tersebut dibandingkan dengan spektrum serapan *crude solasodin* yang digunakan sebagai substrat (Gambar 4), terlihat adanya perbedaan. Senyawa X memberikan serapan yang relatif besar pada daerah panjang gelombang antara 231,7-248,5 nm, sedangkan *crude solasodin* memberikan serapan yang relatif besar pada daerah panjang gelombang antara 220 - 238,5 nm.



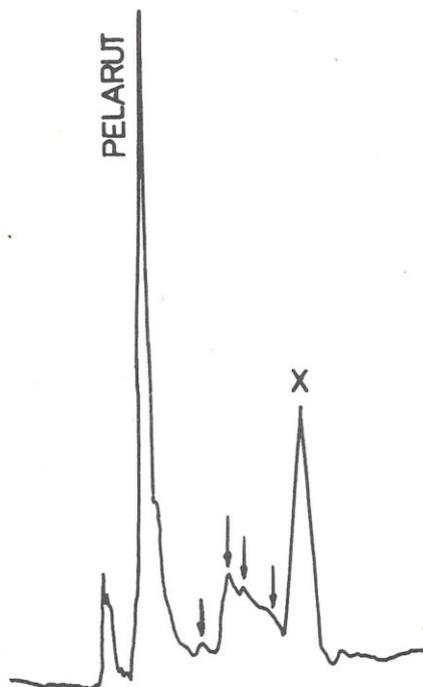
Gambar 3: Spektrum Serapan Senyawa X hasil kromatografi preparatif



Gambar 4: Spektrum Serapan *crude solasodin*.

Hasil pemeriksaan menggunakan KCKT, menunjukkan adanya satu puncak (X) yang relatif besar, meskipun tampak juga 4 puncak lainnya (yang ditunjukkan dengan tanda panah) yang relatif kecil, sebagai ketidakmurnian yang masih mengotori senyawa X (Gambar 5).

Apabila dibandingkan dengan hasil penelitian yang pernah dilaporkan sebelumnya (1,2), dapat disimpulkan bahwa senyawa X ini adalah solasodin yang sudah mengalami perubahan, karena data retensi (t_r) maupun bentuk puncak kromatogram dari senyawa X pada kolom C₁₈ jauh berbeda dengan t_r/bentuk puncak solasodin.

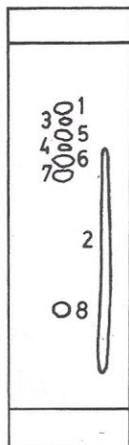


Gambar 5: Kromatogram senyawa X (t_r 9,2 menit) pada KCKT
 Kolom: C_{18}
 Eluen: Asetonitril-larutan bufer tris 0,03 M (80:20).
 Kecepatan aliran eluen: 1,5 ml/menit
 Detektor: UV 254 nm

Selanjutnya dari hasil yang pernah dilaporkan sebelumnya (2), apabila digunakan campuran asetonitril-larutan bufer tris 0,03 M (80:20) dengan kecepatan aliran eluen 4 mL/menit, solasodin akan keluar sebagai puncak yang berekor dengan waktu retensi 10,275 menit, sedangkan senyawa X sudah dapat terelusi keluar dengan waktu retensi 9,2 menit, sekalipun hanya digunakan kecepatan aliran eluen 1,5 mL/menit. Bentuk puncak senyawa X pada kromatogram jauh lebih baik dibandingkan dengan bentuk puncak solasodin.

Pemisahan Solanesol dan Derivat Senyawa Androstan atau Androsten pada Pelat dan Kolom C_{18} .

Solanesol dan 6 macam derivat androstan atau androsten dapat dipisahkan dengan baik pada pelat C_{18} meng-

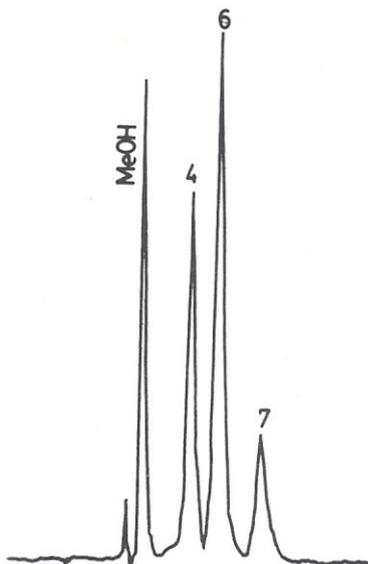


Gambar 6:
 Pemisahan solanesol dan derivat androstan atau androsten pada pelat RP-18.
 Eluen: metanol-kloroform (4:1).
 1 = 5 α -androstan-3 β , 11 β , 17 β -triol.
 2 = solasodin. 3 = 5-androsten-3 β , 17 β -diol.
 4 = 1,4-androsta-dien-3,17-dion (ADD).
 5 = 1, 4, 9, (11)-androstatrien-3, 17-dion.
 6 = 4-androsten-3, 17-dion (AD)
 7 = 5 α -androsten-3,17-dion.
 8 = Solanesol R_f noda 1 = 77; 3 = 74;
 4 = 68; 5 = 71; 6 = 64; 7 = 60; 8 = 26.

gunakan campuran metanol-kloroform (4:1) sebagai eluen. Resolusi pemisahan dapat dilihat pada Gambar 6 di bawah ini. Noda 4,5 dan 6 dapat dideteksi di bawah lampu UV 254 nm, sedangkan noda lainnya baru tampak apabila pelat disemprot dengan larutan 50% H_2SO_4 dalam etanol. Warna noda 1: violet, noda 3: abu-abu, noda 4: jingga, noda 5: merah, noda 6: hijau, noda 7: kuning dan noda 8: merah muda. Dengan kondisi pemisahan di atas, solasodin (senyawa 2) tidak berhasil dipisahkan dengan baik karena bentuk nodanya yang memanjang dan berekor. Hal ini memberikan indikasi bahwa solasodin ditahan relatif kuat oleh fasa diam dan seharusnya untuk mengelusi solasodin hingga diperoleh bentuk noda yang ideal dibutuhkan eluen dengan kepolaran yang relatif lebih rendah dari campuran metanol-kloroform (4:1). Meskipun tentunya pelarut yang relatif non-polar akan memberikan dampak resolusi yang lebih buruk untuk senyawa-senyawa yang sudah dapat terpisah dengan baik.

Pada saat campuran pelarut metanol-kloroform (4:1) digunakan sebagai eluen untuk pemisahan KCKT, timbul permasalahan yang lain. Ternyata dengan campuran pelarut ini senyawa yang dipisahkan keluar bersamaan dengan puncak pelarut. Untuk itu kemudian dicari komposisi pelarut yang justru relatif lebih polar agar senyawa yang dipisahkan dapat lebih ditahan oleh kolom. Berdasarkan alasan ini dipilih kemudian campuran metanol-air (80:20) sebagai eluen.

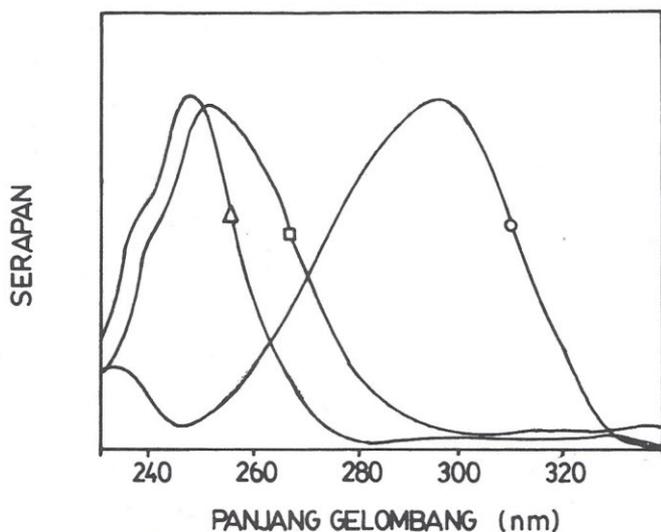
Selain itu, pada saat kondisi pemisahan KLT dipakai untuk pemisahan KCKT ditemui adanya kendala untuk mendeteksi beberapa senyawa. Hal ini disebabkan karena tidak semua senyawa memberikan penyerapan di daerah UV, sedangkan untuk keperluan deteksi di atas pelat, kendala tersebut dapat teratasi dengan jalan menyemprot pelat menggunakan pereaksi pewarna noda yang spesifik untuk steroid. Oleh karena itu pemisahan KCKT hanya dapat dilakukan untuk senyawa-senyawa yang menyerap baik pada panjang gelombang 254 nm, seperti tampak pada Gambar 7.



Gambar 7:
 Pemisahan KCKT dari 5 α -androstan-3, 17-dion, AD dan ADD. Kolom: μ -Bondapak C_{18} WATERS. Eluen: Metanol-air (80:20). Kecepatan aliran eluen: 1 mL/menit. Detektor: UV pada panjang gelombang 254 nm. Puncak 4: ADD t_r = 3,96 menit. Puncak 6: AD t_r = 4,56 menit. Puncak 7: 5 α -androstan-3, 17-dione t_r = 5,54 menit t_o = 2,88 menit, ditentukan dengan jalan menginjeksikan 20 μ L pelarut metanol.

Solanesol sebenarnya dapat terdeteksi pada panjang gelombang 254 nm, akan tetapi dengan kondisi kromatografi di atas, solanesol belum berhasil dielusi. Tampaknya untuk dapat mengelusi secara optimal semua senyawa, diperlukan teknik elusi gradien. Dengan demikian resolusi pemisahan yang sudah relatif baik dari sebagian campuran senyawa akan dapat tetap dipertahankan, sedangkan permasalahan elusi yang masih harus diselesaikan untuk senyawa yang tertahan relatif kuat dalam kolom akan dapat pula di atasi.

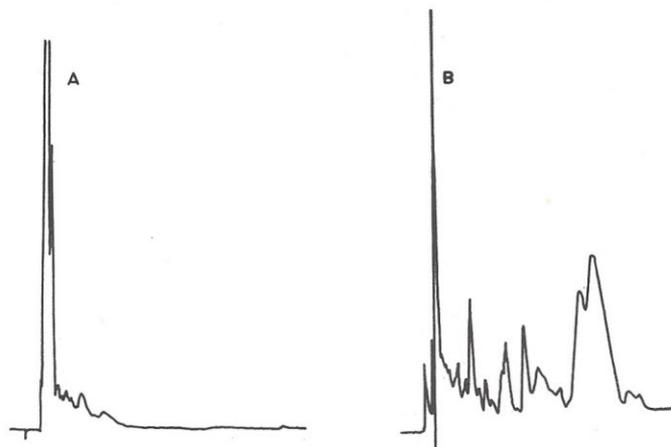
Dengan detektor *diodearray* dapat dibuat spektrum serapan dari ketiga senyawa di atas (Gambar 8). Bentuk dari spektrum serapan ini dapat digunakan untuk mengkonfirmasi puncak kromatogram yang mempunyai waktu retensi sama dengan salah satu dari waktu retensi ketiga senyawa tersebut.



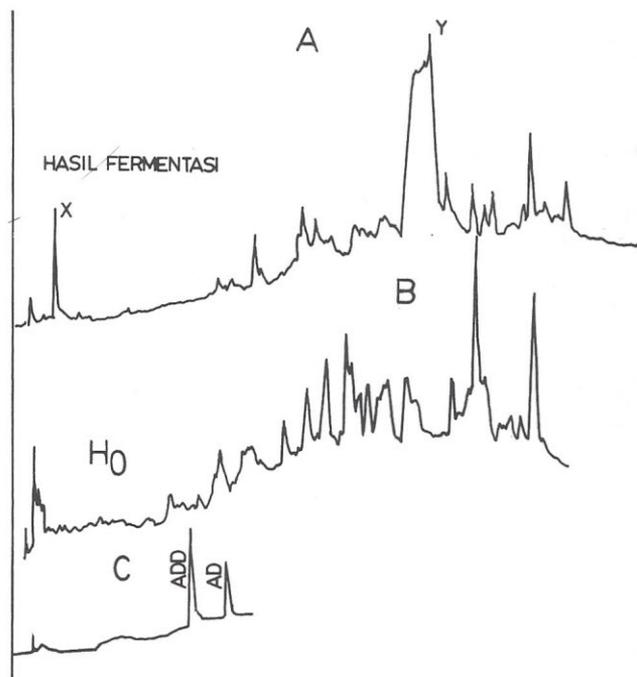
Gambar 8: Spektrum Serapan dari 5 α -androstan-3, 17-dion (o), AD (Δ) dan ADD (\blacksquare).

Pemisahan Campuran Hasil Biokonversi pada Kolom C₁₈ Menggunakan Teknik Elusi Gradien

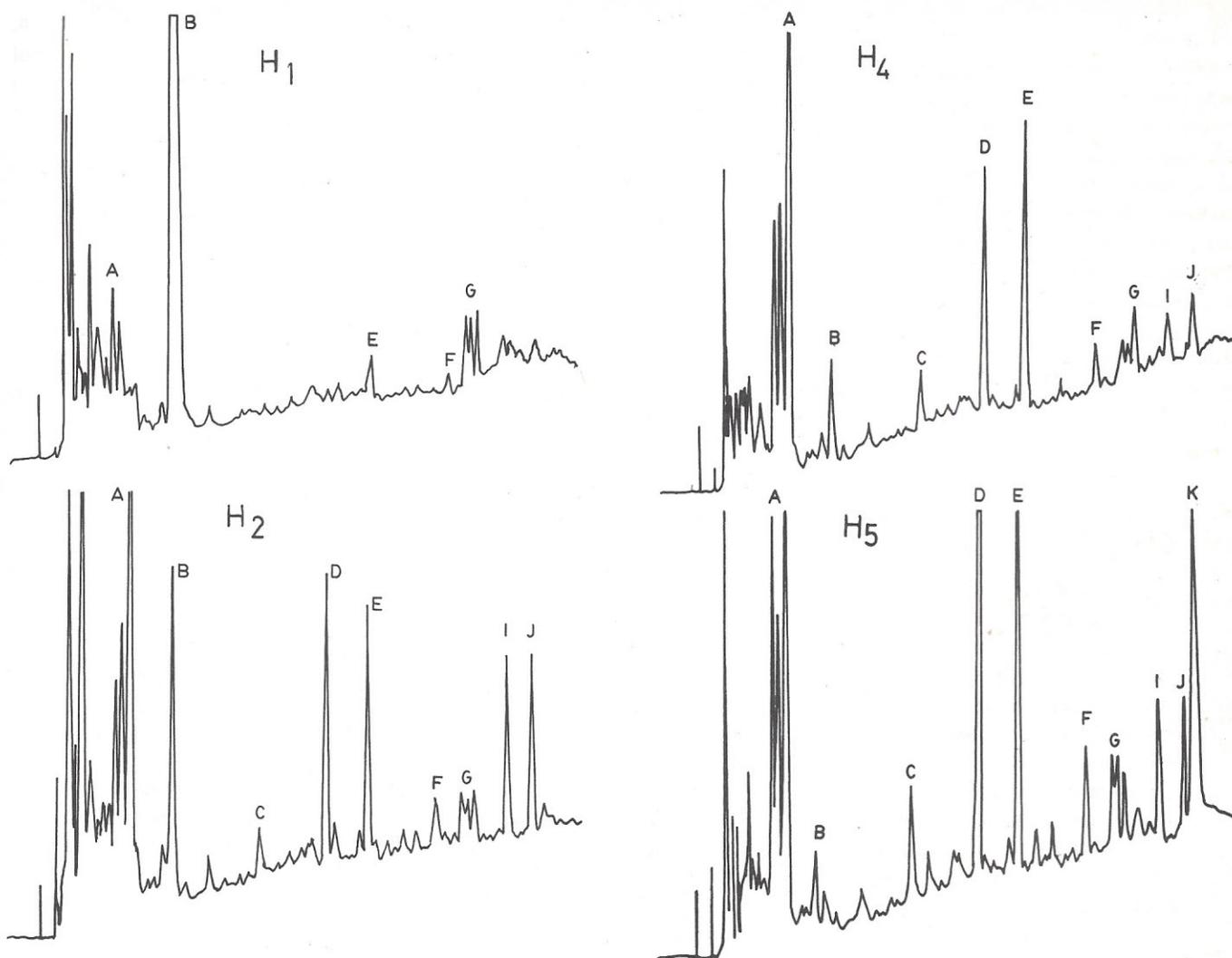
Dari percobaan pendahuluan dapat diketahui bahwa campuran hasil biokonversi lebih cocok untuk dipisahkan dengan mekanisme kromatografi fasa terbalik (KFT), karena pada kromatografi fasa normal (KFN) sebagian besar komponen masih tertahan total di dalam kolom silika. Dapat diamati bahwa setelah beberapa kali injeksi, tekanan balik pada kolom silika mengalami kenaikan dan apabila kolom dibuka akan terlihat bagian atas kolom berubah warna menjadi coklat. Hal ini merupakan indikasi adanya sebagian komponen yang tinggal pada kolom. Selain itu dengan membandingkan Gambar 9A dan B dapat dilihat dengan jelas bahwa untuk suatu campuran hasil biokonversi yang sama, tidak tampak banyak senyawa yang dapat terelusi dari kolom silika, sedangkan sebaliknya pada kromatografi fasa terbalik menggunakan kolom C₁₈ terlihat banyak puncak senyawa dari campuran hasil biokonversi



Gambar 9: Pemisahan Campuran Hasil Biokonversi pada Kromatografi Fasa Normal dan Kromatografi Fasa Terbalik.
Kromatogram A: Kolom Lichrosorb Si 60 (EM 50388)
Eluen: Kloroform-Etanol (48:1)
Kromatogram B: Kolom: μ -Bondapak C₁₈, WATERS
Eluen: Metanol-Air (70 : 30)



Gambar 10: Pemisahan Campuran Hasil Biokonversi pada Kromatografi Fasa Terbalik menggunakan Teknik Elusi Gradien.
Kolom: μ -Bondapak C₁₈, WATERS. Eluen: Metanol-Air.
Elusi: Gradien. Program: Linier dari 50% hingga 100% metanol dalam waktu 60 menit.
Kromatogram A; Campuran Hasil Biokonversi pada hari kelima (H₅).
Kromatogram B: Campuran Hasil Biokonversi pada hari ke nol (H₀).
Kromatogram C: Standar AD dan ADD.



Gambar 11: Pemisahan Campuran hasil biokonversi hari pertama, kedua, keempat dan kelima pada KCKT, menggunakan teknik elusi gradien. Kondisi kromatografi sama dengan kondisi yang digunakan pada Gambar 10.

yang dapat terelusi. Meskipun demikian, untuk KFT, pada kondisi elusi isokratik, menggunakan pelarut metanol-air = 70:30, resolusi pemisahan hasil biokonversi yang diperoleh masih kurang baik seperti tampak pada Gambar 9B. Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa untuk memisahkan lebih sempurna puncak-puncak pada bagian muka kromatogram, dibutuhkan eluen yang relatif lebih lemah dari campuran pelarut di atas. Karena model pemisahan di sini menyangkut mekanisme kromatografi fasa terbalik, maka eluen yang relatif lemah adalah campuran pelarut dengan komposisi air yang lebih banyak. Sebaliknya puncak-puncak pada bagian belakang kromatogram terlihat agak melebar. Untuk memperbaiki bentuk puncak ini, diperlukan eluen yang relatif lebih kuat sehingga mampu menarik puncak senyawa keluar lebih cepat dari kolom. Jika demikian masalahnya, maka diusahakan pada saat mula proses elusi, dialirkan terlebih dahulu eluen yang relatif lemah, sedangkan pada akhir pemisahan dialirkan eluen

yang relatif kuat. Atas dasar pertimbangan ini dipilih kemudian kondisi elusi gradien.

Dengan memperhatikan semua data tersebut di atas, ditetapkan kondisi elusi mulai dengan komposisi pelarut metanol-air = 50:50 dan selama proses elusi, komposisi metanol dinaikkan hingga akhirnya setelah 1 jam komposisi pelarut berubah menjadi metanol 100%. Beberapa perbaikan terhadap unjuk kerja hasil pemisahan dapat ditunjukkan pada Gambar 10 dan Gambar 11.

Pada Gambar 10A, tampak jelas perubahan resolusi pemisahan yang dapat dicapai apabila elusi dilakukan secara gradien. Campuran hasil biokonversi yang digunakan pada Gambar 10A ini sama dengan campuran yang dipakai untuk pemisahan pada Gambar 9A dan B.

Dengan kondisi elusi yang sama, ADD dapat terelusi dalam waktu 11,9 menit, AD dalam waktu 14,75 menit seperti tampak pada Gambar 10C, sedangkan solasodin baru dapat terelusi setelah 30,7 menit.

Dengan membandingkan kromatogram pada Gambar 10A dengan kromatogram campuran hasil biokonversi hari ke nol (H_0) pada Gambar 10B, dapat terdeteksi terbentuknya beberapa puncak baru (X, Y, dan puncak-puncak kecil lainnya) sebagai puncak senyawa yang dihasilkan dalam proses biokonversi. Penelaahan lebih lanjut terhadap puncak-puncak ini akan dapat dilakukan apabila proses biokonversi yang sama dibuat dalam skala yang lebih besar (± 10 liter). Pada saat kondisi elusi ini diaplikasikan untuk memantau proses biokonversi dari batch pengerjaan yang lain, dapat terdeteksi perubahan pembentukan senyawa mulai hari fermentasi pertama (H_1) hingga kelima (H_5). Seperti tampak pada Gambar 11, perbedaan antara kromatogram campuran hasil biokonversi hari pertama (H_1), kedua (H_2), keempat (H_4) dan kelima (H_5) dapat terlihat dengan jelas. Sejalan dengan waktu fermentasi, tinggi puncak yang diberi notasi A, C, D, dan E terlihat makin bertambah, sedangkan tinggi puncak B justru makin berkurang. Perbandingan tinggi puncak F dan G terhadap tinggi puncak I dan J tidak tetap. Pada hari fermentasi pertama, puncak-puncak G lebih tinggi dari puncak I dan J, sedangkan pada hari fermentasi kedua, tinggi puncak I dan J dapat jauh melampaui tinggi puncak F dan G dan akhirnya tinggi keempat puncak ini terlihat hampir berimbang pada hari fermentasi yang keempat dan kelima. Berdasarkan data ini, besar kemungkinan senyawa F, G, I dan J termasuk senyawa antara dalam proses biokonversi tersebut. Puncak senyawa K baru dapat terdeteksi setelah hari fermentasi kelima. Perubahan pembentukan senyawa yang terlihat dengan cukup jelas ini selanjutnya dapat digunakan sebagai alat untuk memantau dan memahami perubahan yang terjadi selama proses biokonversi. Selain itu kondisi elusi gradien yang diperoleh diharapkan dapat diaplikasikan pada proses elusi kolom semi preparatif, dalam upaya mengumpulkan setiap senyawa yang terpisah untuk keperluan penelitian lebih lanjut.

KESIMPULAN

Kondisi pemisahan yang optimal dari campuran hasil biokonversi solasodin dalam skala analitik pada pelat KLT menggunakan silika sebagai fasa diam ternyata mempunyai prospek yang cukup baik untuk digunakan pada pemisahan preparatif campuran hasil biokonversi tersebut.

Dapat dibuktikan melalui pemeriksaan kembali secara kromatografi bahwa senyawa X, yang berhasil dipisahkan dari campuran hasil biokonversi, adalah solasodin yang sudah mengalami perubahan, meskipun belum membentuk senyawa AD atau ADD. Untuk pemisahan Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (KCKT), ternyata lebih baik digunakan mekanisme kromatografi fasa terbalik, karena pada kromatografi fasa normal, sebagian besar senyawa hasil biokonversi masih tertahan total di dalam kolom silika.

Usaha untuk memperbaiki resolusi pemisahan dari campuran hasil biokonversi pada KCKT dapat ditempuh dengan jalan melakukan teknik elusi gradien pada kolom

analitik C_{18} dengan campuran metanol-air sebagai eluen, menggunakan program linier mulai dari 50% metanol hingga 100 % metanol dalam kurun waktu 60 menit. Perlu diteliti lebih lanjut, apakah kondisi elusi gradien yang diperoleh untuk kolom analitik ini dapat juga digunakan untuk kolom semi preparatif atau preparatif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian yang diinisiasi dalam Proyek Bioteknologi AAACP phase II, tahun 1990-1992 ini, dapat dilanjutkan dengan adanya dana penelitian yang diperoleh dari Proyek DIP tahun anggaran 1992/1993 dan 1993/1994.

PUSTAKA

1. S. Pujiraharti, T.A. Budiwati, J. Kantasubrata, A.T. Karossi, Solasodine Steroid Bioconversion by *Mycobacterium Phlei* DSM 43286, *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*, 2: 75-79 (1992).
2. J. Kantasubrata, Loyniwati, Jamilah, A.T. Karossi, Kromatografi Lapisan Tipis (KLT) dan Kromatografi Cairan Tekanan Tinggi (KCKT) dari Solasodine, AD dan ADD, *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*, 3: 61-68 (1993).
3. J. Kantasubrata, T.Y. Fitri, V.A. Halomoan, P. Lotulung, Buchori, A.T. Karossi, Analytical Methods for Determination of Solasodine and its Bioconversion Products, *Annales Bogorieneses*, 2: 12-15 (1993).
4. H.S. Kim, C.K. Choi, Y.H. Park, Determination of Cholesterol and Its Fermentation Products by High Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, 398: 372-374 (1987).
5. Lin, Jiann-Tsyh, E. Heftmann, Comparison of Adsorption and Reversed-Phase Partition High Performance Liquid Chromatography for the Separation of Androgens, *J. Chromatogr.*, 237: 215-224 (1982).
6. H. Singh, D. Paul, T.R. Bhardwaj, K.K. Bhutani, J. Ram, Thin-layer Chromatography of Some Steroidal Ketones, Oximes and Lactams, *J. Chromatogr.*, 137: 202-205 (1977).
7. H. Singh, D. Paul, T.R. Bhardwaj, A. Kumar, Chaudhary, S. Kapoor, R. Kumar, K.K. Bhutani, Thin-layer Chromatography of Some Steroidal Ketones, Oximes, Amides, Lactams, and Tetrazoles, *J. Chromatogr.*, 176: 255-259 (1979).
8. H. Singh, D. Paul, T.R. Bhardwaj, A. Kumar, Chaudhary, R.K. Gupta, Thin-layer Chromatography of Some Azasteroids, *J. Chromatogr.*, 240: 264-267 (1982).
9. E. Heftmann, I.R. Hunter, High-Pressure Liquid Chromatography of Steroids, *J. Chromatogr.*, 165: 283-299 (1979).
10. R. Jellema, E.T. Elema, Th.M. Malingre, Optical Brighteners as Thin-layer Chromatography Detection Reagents for Glycoalkaloids and Steroids Alkaloids in Solanum Species, *J. Chromatogr.*, 176: 435-439 (1979).
11. I.R. Hunter, M.K. Walden, E. Heftmann, High Performance of Solanum and Veratrum Alkaloids, *J. Chromatogr.*, 198: 363-366 (1980).