

# ANALISIS ASAM AMINO DENGAN METODE KCKT DAN AGEN PENDERIVAT NINHIDRIN

*by Pri Iswati*

---

**Submission date:** 15-Sep-2023 07:55AM (UTC+0700)

**Submission ID:** 2166448180

**File name:** ANALISIS\_ASAM\_AMINO\_DENGAN\_METODE\_KCKT\_DAN\_AGEN\_PENDERIVAT.pdf (413.06K)

**Word count:** 1255

**Character count:** 7812



## ANALISIS ASAM AMINO DENGAN METODE KCKT DAN AGEN PENDERIVAT NINHIDRIN

### ANALYSIS OF AMINO ACID USING HPLC METHOD AND NINHYDRINE AS DERIVATIV AGENT

<sup>1)</sup>Wiranti Sri Rahayu, <sup>2)</sup>Pri Iswati Utami, <sup>3)</sup>Fahmi Haryadin

<sup>1,2,3)</sup>Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi

Universitas Muhammadiyah Purwokerto

Jl KH Ahmad Dahlan Dukuh Waluh Kembaran Banyumas Jawa Tengah

\*Email: [wirantisriahayu@ump.ac.id](mailto:wirantisriahayu@ump.ac.id)

#### ABSTRAK

Asam amino pembangun protein adalah asam amino esensial yang tidak dapat disintesis atau tidak dapat dihasilkan oleh tubuh dan asam amino non esensial yang dapat disintesis oleh tubuh. Salah satu metode yang digunakan untuk analisis asam amino adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan KCKT dengan fase diam C-18 untuk menganalisis asam amino dengan derivatisasi menggunakan ninhidrin dan kondisi optimum untuk menganalisis asam amino.

**Kata Kunci :** asam amino, KCKT, ninhidrin

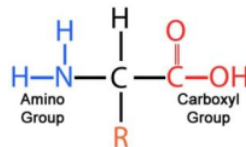
#### ABSTRACT

Protein-building amino acids are essential amino acids that cannot be synthesized or can be produced by the body and non-essential amino acids that can be synthesized by the body. One of the methods used for amino acid analysis is high performance liquid chromatography (HPLC). The purpose of this research was to determine the ability of HPLC with C-18 stationary phase to analyze amino acids by derivatization using ninhydrin and the optimum conditions for analyzing amino acids.

**Keywords :** amino acid, HPLC, ninyhidrin.

#### PENDAHULUAN

Asam amino adalah senyawa aktif biologis dan merupakan penyusun protein yang ada di makanan dan minuman, zat yang penting untuk nutrisi manusia dan mempengaruhi kualitas makanan termasuk rasa, aroma, dan warna dengan struktur seperti gambar 1 (Melva, 2014). Asam amino adalah penanda yang berguna untuk menentukan keaslian suatu produk baik nabati maupun hewani. Proline (PRO) telah dimasukkan dalam peraturan Eropa untuk menguji keaslian jus buah dan nektar. Pengembangan metode analisis untuk menghasilkan metode analisis yang cepat dan akurat yang diperlukan untuk menilai kualitas makanan. Banyak metode analitis telah diusulkan untuk analisis asam amino, termasuk kromatografi gas, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), dan elektroforesis kapiler. Asam amino yang ada dalam makanan biasanya dianalisis setelah dilakukan derivatisasi. HPLC fase terbalik dengan prekolumn derivatisasi lebih disukai karena waktunya singkat, sederhana dan murah (Friedman, 2004).



Gambar1 Rumus umum asam amino

Reagen khas untuk derivatisasi prakolumn adalah fenilisotiosianat (PITC); ninhidrin, o-phthalaldehyde (OPA); 9 fluorenylmethyl-chloroformate (FMOC-Cl); 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene; 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L alanin amida; dan dansil-klorida. Masing-masing reagen ini memiliki kelebihan dan keterbatasan tertentu. Kekurangan kromofor pada sebagian besar asam amino dan rantai samping yang sangat hidrofobik ada di sebagian besar asam amino, membuat pengembangan metode HPLC lebih menantang. Beberapa metode dimungkinkan baik kualitatif maupun kuantitatif untuk analisis sebagian besar asam amino. Makalah ini



membahas pengembangan metode dan validasi metode yang dikembangkan. Fokus tinjauan ini adalah untuk analisis asam amino dengan post-kolom derivatisasi untuk meningkatkan sensitivitas dan selektivitas (Asensio et al, 2008; Buchberger. and Ferdig. 2004; Cordella, et al, 2002)

#### **METODE**

##### 1. Preparasi baku asam amino

Baku asam amino yang terdiri dari histidin, leusin, dan metionine ditimbang sebanyak 10 mg lalu dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml ditambah kan akuabides sampai tanda dan didapatkan konsentrasi 1000 µg/ml.

##### 2. Pembuatan larutan penderivatisasi

Ninhidrin ditimbang sebanyak 200 mg, dimasukkan labu takar 10 ml kemudian ditambahkan akuabides sampai tanda, selanjutnya sonikasi selama 30 menit (Buchberger, 2004)

##### 3. Derivatisasi dan analisis menggunakan KCKT Metode 1

Asam amino histidin, leusin, dan metionine dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 4 ml akuabides, lalu ditambahkan 1 ml ninhidrin, divortex selama 5 menit kemudian dipanaskan pada waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit, lalu ditambahkan 1 ml etanol dan vortex selama 5 menit, dan 0,1 ml dapar asetat 0,2 M pH 5,1 (menimbang Natrium asetat 3,28 gram larutan dengan akuabides 200 mL, melarutkan 2,4 mL asam asetat ditambahkan 200 mL akuabides. 23 mL Natrium asetat ditambahkan 32 mL asam asetat tambahkan NaCL atau HCl untuk mendapat pH 5,1) (FI III, 1979) (Sashidar, 2005). Larutan yang telah diderivatisasi disaring dengan membran filter 0,45 µm, diinjeksikan sebanyak 20 µL ke KCKT.

#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Derivatisasi dilakukan pada asam amino karena secara umum asam amino adalah senyawa yang tidak memiliki gugus kromofor kecuali asam amino fenilalanin, tirosin, dan triptofan. Oleh karena itu dilakukan derivatisasi asam amino yang bertujuan untuk mengasilkan derivate yang mampu berfluoresensi sehingga pengukuran menjadi lebih efektif dan sensitif ( Buchberger. W. and Ferdig. M. 2004).

Ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi saat reaksi derivatisasi. Persyaratan reaksi derivatisasi yang harus dipenuhi diantaranya adalah produk reaksi derivatisasi yang dihasilkan mampu menyerap sinar ultraviolet atau sinar tampak dengan baik atau membentuk senyawa berfluoresen agar dapat dideteksi pada KCKT, proses derivatisasi harus berlangsung secara cepat dan menghasilkan produk yang sebesar mungkin dan produk hasil derivatisasi harus stabil selama proses derivatisasi dan deteksi (Rohman, 2007). Agen penderivat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ninhidrin. Reaksi ninhidrin melibatkan tipe nukleofilik perpindahan gugus OH dari ninhidrin hidrat oleh gugus amino nonprotonated. Reaksi asam amino-R dengan ninhidrin memerlukan dua reaksi molekul ninhidrin untuk setiap molekul asam amino yang akan terbentuk molekul ungu Ruheman (Buchberger. W and Ferdig. M. 2004).

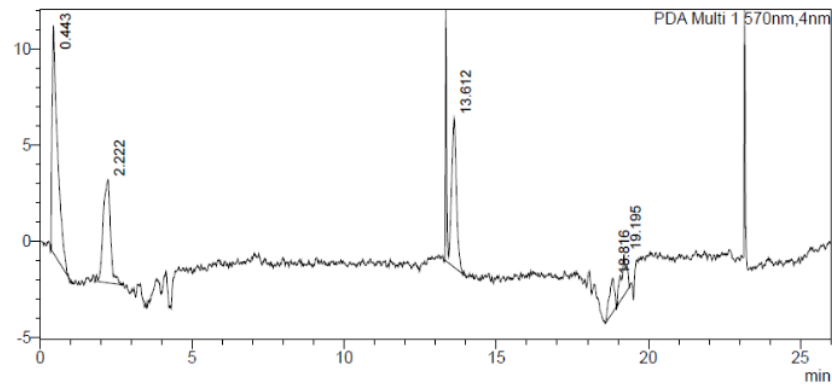
Pemanasan dilakukan pada suhu 90°C berfungsi agar protein terdenaturasi, sehingga molekul protein yang terdiri dari banyak polipeptida dapat terputus menjadi molekul-molekul penyusunnya yang lebih kecil, sehingga akan mempercepat reaksi dengan ninhidrin. Buffer asetat 0,2 M pH 5,1 ditambahkan untuk memperbaiki resolusi dan selektivitas. Hasil analisis asam amino dengan metode pertama dapat dilihat pada gambar 2.

Berdasarkan gambar 2 dapat dilihat pada kromatogram histidin, leusin, metionin yang menggunakan fase gerak asetonitril:akuabides 60:40 untuk memisahkan sampel pada metode pertama menghasilkan beberapa puncak sehingga tidak dapat ditentukan puncak dari asam amino yang dipisahkan. Hal ini dapat terjadi karena pH sampel yang diinjeksikan berada pada nilai 11 yang akan meyebabkan kompleks derivatisasi dengan ninhidrin tidak terbentuk secara sempurna karena pH yang dikehendaki adalah 5,5, selain itu pH yang tinggi akan menyebabkan terlarut nya fase diam yang akan memperpendek ketahanan kolom.



<Chromatogram>

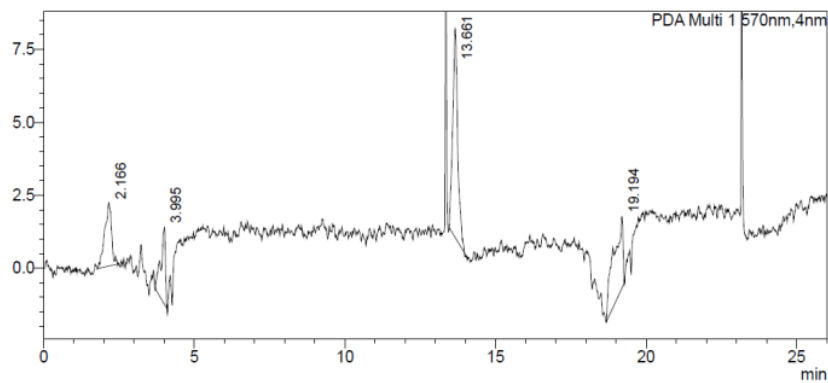
mAU



(a)

<Chromatogram>

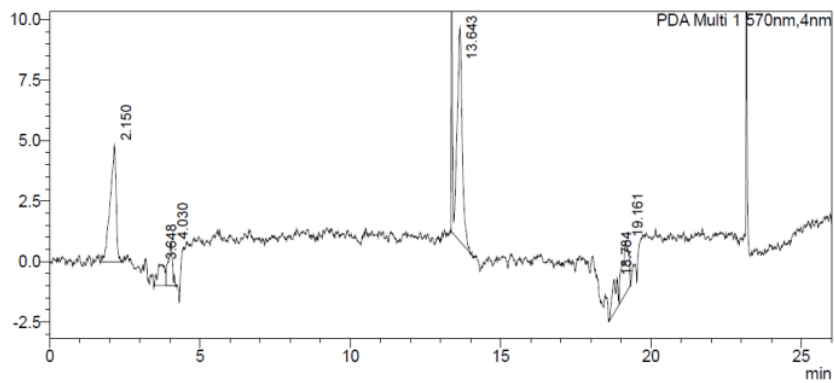
mAU



(b)

<Chromatogram>

mAU



(c)

Gambar 2 Kromatogram baku standar (a) histidin; (b) leusin; (c) metionin



## KESIMPULAN

Kondisi KCKT untuk memisahkan tiga asam amino, fase gerak berupa metanol:air 60:40 fase diam Purospher C18 150mm x 4,6 mm suhu 40°C laju alir 1 ml/menit dengan volume injeksi 20  $\mu$ l deteksi pada lamda 570 nm belum mampu untuk memisahkan campuran ketiga asam amino.

## DAFTAR PUSTAKA

- Asensio, L., González, I., García, T., Martín, R., 2008. *Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Food Control
- Buchberger, W., Ferdig, M. 2004. *Improved High Performance Liquid Chromatographic Determination of Guanidino Compounds by Precolumn Derivatization with Ninhydrin and Fluorescence Detection*. Johannes-Kepler-University. Austria
- Cordella, C., Moussa, I., Martel, A.-C., Sbirrazzuoli, N., Lizzani-Cuvelier, L., 2002. *Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives*. J. Agric. Food Chem. 50, 1751–1764.
- Friedman M., 2004, Review: Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences, J. Agric. Food Chem.52, 385-406
- Melva, F.D. 2010. *Fungsi Metabolisme Protein Dalam Tubuh Manusia*. Jurnal Kesehatan Masyarakat Vol 4

# ANALISIS ASAM AMINO DENGAN METODE KCKT DAN AGEN PENDERIVAT NINHIDRIN

---

## ORIGINALITY REPORT

---

13%

SIMILARITY INDEX

13%

INTERNET SOURCES

5%

PUBLICATIONS

2%

STUDENT PAPERS

---

## MATCH ALL SOURCES (ONLY SELECTED SOURCE PRINTED)

---

1%

★ [yulipertiwii.blogspot.com](http://yulipertiwii.blogspot.com)

Internet Source

---

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On