

# Pemisahan Kromatografi Lapis Tipis pada Asam Amino dengan Menentukan Nilai Faktor Retensi

## *Thin Layer Chromatographic Separation of Amino Acids by Determining the Resistivity Factor Value*

Dila Aulia Hafizah<sup>1</sup>, Sunardi<sup>2\*</sup>

<sup>1,2</sup>Program Studi Analisis Kimia, Fakultas Teknik Universitas Setia Budi, Surakarta

Jln. Letjen Sutoyo-Mojosongo Surakarta-57127 Telp. 0271-852578

Corresponding Author: [sunardi@setiabudi.ac.id](mailto:sunardi@setiabudi.ac.id)

**ABSTRAK:** Penelitian telah dilakukan untuk memisahkan asam amino menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menentukan nilai faktor retensi (Rf). Asam amino adalah komponen penting dari protein yang memiliki berbagai fungsi dalam tubuh. KLT merupakan metode kromatografi sederhana yang sering digunakan untuk memisahkan dan mengidentifikasi komponen kimia dalam suatu campuran. Dalam penelitian ini, KLT digunakan untuk memisahkan empat jenis asam amino, yaitu histidin, triptofan, glisin, dan alanin. Prosedur KLT mencakup persiapan pelat silika, penotolan sampel, pembentukan kromatogram dengan elusi berbagai pelarut, dan penentuan nilai Rf setiap sampel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setiap sampel asam amino memiliki nilai Rf yang berbeda karena perbedaan kepolaran masing-masing asam amino terhadap fase diam pelat silika dan pelarut yang digunakan. Namun, nilai Rf yang diperoleh belum sesuai dengan teori karena terdapat kesalahan dalam persiapan pelat silika.

**Kata kunci :** Asam amino, kromatografi lapis tipis, tryptofan, glisin, alanin, histidin

**ABSTRACT:** Research has been conducted to separate amino acids using thin layer chromatography (CLT) by determining the retention factor (Rf) value. Amino acids are important components of proteins that have various functions in the body. KLT is a simple chromatographic method that is often used to separate and identify chemical components in a mixture. In this study, KLT was used to separate four types of amino acids, namely histidine, tryptophan, glycine, and alanine. The KLT procedure includes silica plate preparation, sample bottling, chromatogram formation by elution of various solvents, and determination of the Rf value of each sample. The results showed that each amino acid sample has a different Rf value due to differences in the polarity of each amino acid to the stationary phase of the silica plate and the solvent used. However, the Rf values obtained are not in accordance with the theory because there are errors in the preparation of silica plates.

**Keywords:** Amino acids, chromatography, tryptophan, glycine, alanine, histidine

## 1. PENDAHULUAN

Pemisahan asam amino dengan kromatografi telah menjadi topik yang sangat penting dalam biologi molekuler dan analisis biomolekuler. Dalam penelitian ini, kita akan membahas tentang cara efektif memisahkan asam amino menggunakan kromatografi. Penelitian ini penting karena memungkinkan analisis lebih akurat dan cepat dari asam amino

yang terkait dengan berbagai proses biologis.

Asam amino sendiri bersifat amfoterik, artinya berperilaku sebagai asam dan mendonasikan proton pada basa kuat, atau dapat juga berperilaku sebagai basa dan menerima proton dari asam kuat. Asam amino yang terdapat sebagai komponen protein mempunyai gugus  $-NH_2$  pada atom karbon  $\alpha$  dari posisi gugus -

COOH, atom karbon yang mengikat atom hidrogen, dan satu gugus R (rantai samping) yang berbeda, dimana struktur gugus R menentukan identitas atau karakter spesifik asam amino dan sifat-sifat khasnya seperti sifat polaritasnya (Dewi, 2023).

Ada beberapa metode untuk menganalisis asam amino, salah satunya yang paling umum adalah kromatografi. Jenis-jenis kromatografi meliputi kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi penukar ion. Kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk menentukan jumlah komponen dalam campuran, mengidentifikasi senyawa, memantau kemajuan suatu reaksi, dan terutama untuk menentukan kemurnian serta identitas suatu senyawa isolat, dengan menggunakan parameter nilai faktor retensi atau angka  $R_f$  (Oktaviana Putri et al., 2024). Prinsip kromatografi adalah bahwa molekul yang dipisahkan bergerak melalui media dengan kecepatan berbeda. Perbedaan ini terjadi karena molekul memiliki afinitas tertentu terhadap media atau karena ukuran media hanya memungkinkan molekul tertentu untuk melewatinya (Murti, 2022).

Kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kertas adalah dua metode kromatografi paling sederhana yang sering digunakan. Peralatan dan bahan yang diperlukan untuk pemisahan dan analisis sampel dengan metode KLT cukup sederhana, yaitu sebuah bejana tertutup (chamber) yang berisi pelarut dan lempeng

KLT. Dengan mengoptimalkan metode dan menggunakan instrumen komersial yang tersedia, pemisahan yang efisien dan hasil kuantitatif yang akurat dapat dicapai.

Analisis dengan KLT dimulai dengan menotolkan sedikit sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT) untuk membentuk zona awal, kemudian sampel tersebut dikeringkan. Ujung fase diam yang mengandung zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal atau campuran dua hingga empat pelarut murni) di dalam chamber. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, komponen-komponen dalam sampel akan bermigrasi dengan kecepatan berbeda saat fase gerak bergerak melalui fase diam. Proses ini disebut pengembangan kromatogram.

Dalam penelitian dengan KLT dapat ditentukan nilai  $R_f$  yang membantu perhitungan dalam pemisahan asam amino. Nilai  $R_f$  bersifat khas untuk senyawa tertentu dalam eluen tertentu. Nilai  $R_f$  dapat digunakan sebagai bukti untuk mengidentifikasi senyawa (Pratiwi, D. N., et al, 2021). Jika nilai  $R_f$  yang diidentifikasi sama, ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki karakteristik yang serupa atau mirip. Sebaliknya, perbedaan dalam nilai  $R_f$  menunjukkan bahwa senyawa tersebut berbeda atau memiliki sifat yang berbeda (Sunu, B. 2018).

## 2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam percobaan ini adalah sendok spatula, plat penyangga besi, batang pengaduk, isolasi, neraca analitik, hot air oven, pipet tetes, dan kertas kambing.

Bahan-bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah silika gel, asam asetat glasial, aquades, N-butanol, penyemprot cupri sulfat, penyemprot *ninhydrin*, *histidine*, *tryptophan*, *glysin*, dan *alanin*.

## 2.2 Prosedur

Siapkan potongan kaca kemudian cuci bersih dengan pencuci yang bebas dari lemak lalu dikeringkan setelah kering pinggirnya dipasang kertas kulit kambing yang dipotong kurang lebih 1,5 cm dan ditempel dengan isolasi yang bening. Kemudian disiapkan batang pengaduk. Lalu menimbang *silica gell* sebanyak 15 gram. Selanjutnya melarutkan dengan air sebanyak 25 ml di dalam *beaker glass* ukuran 100 ml. Diaduk hingga homogen selama kira-kira 30 detik. Menumpahkan larutan *silica gell* ke kaca dan ratakan. Memasukkan ke dalam hot air oven dengan suhu 70°C. Kemudian tetesi dengan asam amino histidin, triptophan, glisin, dan alanin lalu keringkan dengan hot air oven. Setelah itu rendamkan dengan eluen di buat dari n-butanol, asam asetat galcial, dan aquadest. Diamkan rendaman hingga eluennya naik mencapai kira-kira 10 cm ke atas. Setelah itu, keringkan kembali. Setelah kering disemprot

menggunakan penyemprot *ninhydrin* lalu keringkan menggunakan hot air oven. Setelah kering disemprot menggunakan penyemprot cupri sulfat dan keringkan kembali menggunakan hot air oven.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kromatografi adalah metode pemisahan yang berdasarkan distribusi diferensial komponen sampel antara dua fase. Secara definisi, kromatografi terdiri dari dua fase: fase gerak (*mobile phase*) dan fase diam (*stationary phase*) (Hage, 2018). Kromatografi Lapis Tipis adalah jenis kromatografi cair-cair di mana fase diamnya berupa lapisan tipis air yang diserap oleh kertas. Selain itu saat digunakan pelarut lainnya. Pengerjaanya sangat sederhana dengan penotolan satu tetes cuplikan pada kertas yang sudah ditandai kemudian dicelupkan ke dalam pelarut untuk memisahkan komponen-komponen yang ada dalam cuplikan (Asmarani *et al.*, 2021).

Proses identifikasi menggunakan KLT bertujuan untuk mengamati pemisahan sampel melalui pola kromatogram yang khas pada ekstrak. Ini didasarkan pada perbedaan kepolaran antara sampel dan pelarut (eluen), serta memberikan gambaran awal tentang komposisi kimia berdasarkan pola kromatogram tersebut (Nunung *et al.*, 2019). Ekstrak dipipetkan ke dalam pelat KLT, lalu dimasukkan ke dalam ruang yang berisi campuran pelarut yang sudah mencapai titik jenuh (Fajriaty *et al.*, 2018).

Kromatografi lapis tipis yang diterapkan dalam uji asam amino dilakukan dengan menilai faktor retensi. Prinsip dasar Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah memisahkan komponen campuran berdasarkan perbedaan mobilitasnya antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak.

Fase stasioner (atau fase diam) dan fase gerak memiliki peran yang penting masing-masing. Fase stasioner adalah komponen utama yang menentukan perbedaan dalam kromatografi karena adanya interaksi dengan fase stasioner, menyebabkan variasi dalam waktu retensi ( $R_f$ ) serta pemisahan komponen-komponen senyawa. Sementara itu, fase gerak berperan sebagai pembawa analit yang dapat berinteraksi dengan senyawa analitik (Murti, 2022). Penelitian ini memanfaatkan sampel yang terdiri dari histidin, triptofan, glisin, dan alanin.

Histidin merupakan asam amino esensial yang berperan sebagai prekursor nutrisi untuk beberapa hormon, seperti hormon pelepas tirotropin, dan metabolit penting yang memengaruhi berbagai fungsi tubuh seperti ginjal, transmisi saraf, sekresi lambung, dan sistem kekebalan tubuh. Sifat asam atau basa yang unik pada histidin membuatnya menjadi residu katalitik yang serbaguna dalam banyak enzim, serta dalam protein dan enzim yang mengkoordinasikan ion logam (Aleeza T. Kessler & Avais Raja, 2023).

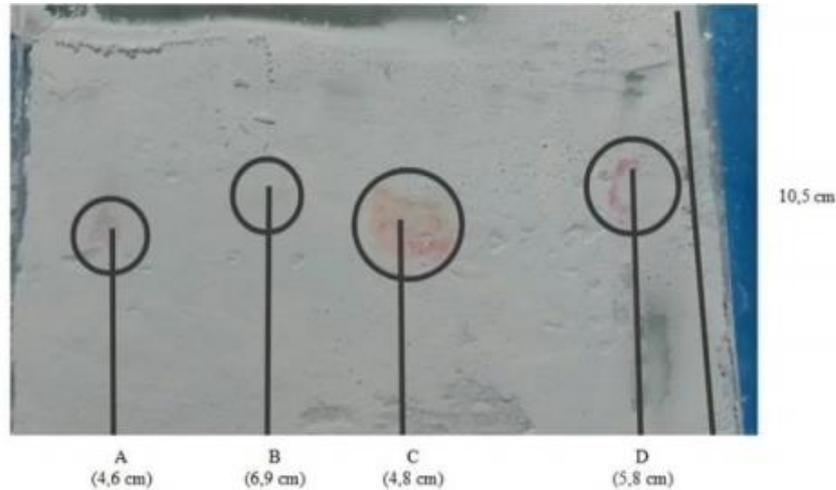
Triptofan adalah salah satu jenis asam amino esensial yang memegang peranan

penting dalam pertumbuhan ikan. Selain itu, triptofan juga berfungsi sebagai prekursor untuk pembentukan serotonin di dalam otak. Ketika ikan mengonsumsi triptofan dalam jumlah yang lebih besar, produksi serotonin di otaknya cenderung meningkat. Kadar serotonin yang lebih tinggi dalam otak berhubungan dengan penurunan tingkat agresivitas pada ikan (Lustikaiswi *et al.*, 2021).

Gliserin adalah zat cair yang tebal dan tidak berwarna, memiliki berat molekul sebesar 92 dan berat jenis sekitar 1,25 gr/cm<sup>3</sup>. Titik didihnya tinggi dan terurai pada suhu sekitar 290°C. Gliserin adalah senyawa yang memiliki lebih dari dua gugus hidroksil, atau dapat disebut juga sebagai tiga senyawa alkohol yang terkait erat, yang secara resmi dikenal dengan nama 1,2,3-propanatriol (M. Afif Aufari *et al.*, 2013).

Alanin merupakan komponen kimia dari asam amino yang berfungsi sebagai pemicu respons pada organ penciuman berbagai jenis ikan. Selain berperan sebagai pemicu respons pada organ penciuman, alanin juga memiliki efek stimulasi pada nafsu makan ikan, yang secara signifikan memengaruhi perilaku makanannya. Alanin termasuk dalam jenis asam amino nonesensial yang memiliki sifat netral dan nonpolar pada pH mendekati 7, serta memiliki rantai hidrokarbon yang bercabang (Rahayu *et al.*, 2014).

Hasil jarak yang ditempuh zat terlarut pada histidine, triptofan, glisin, dan alanin dapat dilihat pada gambar 1.



**Gambar 1 Pola Kromatogram dan Bercak pada Pemeriksaan Senyawa Asam Amino pada Histidin, Triptofan, Glisin, dan Alanin**

Berdasarkan hasil diatas dapat ditentukan nilai Rf-nya dengan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

a) Sampel Histidin

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

$$\text{Nilai Rf} = \frac{4,6}{10,5} = 0,438$$

b) Sampel Triptofan

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

$$\text{Nilai Rf} = \frac{6,9}{10,5} = 0,657$$

c) Sampel Glisin

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

$$\text{Nilai Rf} = \frac{4,8}{10,5} = 0,457$$

d) Alanin

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

$$\text{Nilai Rf} = \frac{5,8}{10,5} = 0,552$$

Faktor retensi, yang disingkat Rf, dihitung dengan membagi jarak yang ditempuh oleh tiap sampel dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut. Berdasarkan perhitungan ini, diperoleh nilai Rf untuk sampel histidin, triptofan, glisin, dan alanin berturut-turut, yaitu 0,438; 0,657; 0,457; dan 0,552.

Jarak tempuh dari setiap sampel berbeda nilainya, ini dipengaruhi oleh kepolaran (prinsip *like dissolve like*) dari sampel tersebut. Plat silika berperan sebagai fase diam yang bersifat polar

sehingga komponen yang kurang diserap oleh absorben akan lebih cepat naik pada plat.

Dalam hal ini, komponen yang kurang diserap oleh absorban adalah sampel yang sifatnya nonpolar (triptofan) dan komponen yang kuat diserap adalah sampel yang sifatnya polar (histidine, alanin, dan glysin). Sehingga terlihat bahwa histidine memiliki jarak tempuh paling pendek disebabkan oleh sifatnya yang polar dan akan diserap dengan kuat oleh fase diam atau absorben. Akan tetapi, senyawa dengan sifat yang sama pun jarak tempuhnya berbeda itu disebabkan oleh faktor selain kepolaran, yaitu diantaranya Tingkat afinitas masing-masing sampel terhadap fase gerak dan fase diam.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil percobaan dapat diambil Kesimpulan bahwa kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk memisahkan asam amino. Berdasarkan data yang didapat nilai Rf masing-masing sampel yaitu histidine, triptofan, glysin, dan alanin secara berturut-turut yaitu 0,438; 0,657; 0,457; dan 0,552. Namun terjadi kesalahan dalam percobaan sehingga nilai Rf tersebut jauh dari nilai Rf pada teori. Salah satu faktor pemicu kesalahan tersebut yaitu silika gel yang digunakan untuk plat terlalu tebal dan kurang rata.

## DAFTAR PUSTAKA

Aleeza T. Kessler and Avais Raja. (2023). *Biokimia, Histidin*. 30 Juli 2023.

Namun pada percobaan kali ini nilai Rf dari setiap sampel yang didapat tidak sesuai dengan nilai Rf yang ada didalam teori. Hal ini disebabkan oleh plat silika yang digunakan terlalu tebal serta silika gel pada plat tidak rata sehingga memengaruhi penyerapan sampel. Selain faktor tersebut juga penyebab lain dari kegagalan ini adalah karena proses penjuanan dilakukan terlalu cepat. Pelarut atau eluen dalam chamber belum mengalami penjuanan dengan sempurna namun plat silika telah dimasukkan dalam chamber.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538201/>

Asmarani, D. R., Lestari, K. W., Novayanti, N., Primandini, R. A., Prayoga, R. A., & Rahadiani, T. A. (2021). Identifikasi Tinta dan Asam Amino Menggu. *Academia*, 1–8.

Dewi, N. M. D. P. (2023). Pemisahan Asam Amino dalam Berbagai Sampel Bahan Alam dengan Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Multidisiplin*, 1(3), 184–189.

Fajriaty, I., IH, H., & Setyaningrum, R. (2018). Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis dari Ekstrak Etanol Daun Bintangur

- (Calophyllum soulattri burm. F.). *Jurnal Pendidikan Informatika Dan Sains*, 7(1), 54–67.
- Hage, D. S. (2018). Chromatography. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry.
- Lustikaiswi, D. K., Yuliani, S., Annura, R., & Rahmadani, E. (2021). Tryptophan in banana peel (*Musa paradisiaca*) as an anti-dementia alternative treatment: A narrative review. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*, 175–181. <https://doi.org/10.20885/jkki.vol12.iss2.art11>
- M. Afif Aufari, Sia Robianto, & Renita Manurung. (2013). Pemurnian Crude Glycerine Melalui Proses Bleaching Dengan Menggunakan Karbon Aktif. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 2(1), 44–48. <https://doi.org/10.32734/jtk.v2i1.1426>
- Murti, G. S. W. (2022). Pemisahan Senyawa Dengan Kromatografi. *Organic Chemistry*, 2(1), 4–6.
- Nunung, Sri Luliana, Pratiwi A. (2019). IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID EKSTRAK DAUN SENGGANI (*Melastoma malabathricum* L.) MENGGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT), *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*. Vol. 4 No. 1.
- Oktaviana Putri, A., Cahaya Hati, M., Putri Ishanti, N., Srivaliana Ilham, H., & Studi Farmasi, P. (2024). Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Beberapa Jenis Tanaman dengan Kromatografi Lapis Tipis: Literature Review Identification of Flavonoid Compounds in Several Types of Plants Using Thin Layer Chromatography: Literature Review. *PHARMADEMICA: Jurnal Kefarmasian Dan Gizi*, 3(2), 45–54. <https://doi.org/10.54445/pharmademica.v3i2.40>
- Rahayu, M., Pramonowibowo, & Yulianto, T. (2014). Profil Asam Amino yang Terdistribusi Ke Dalam Kolam Air Laut Pada Ikan Kembung (*Rastrelliger kanagurta*) Sebagai Umpan (Skala Laboratorium). *Journal of Fisheries Resources Utilization Management and Technology*, 3(3), 238–247.
-