

# ANALISIS KUALITATIF FENILALANIN SECARA CHROMATOGRAPHY KERTAS DAN CHROMATOGRAPHY LAPIS TIPIS

(Studi Awal Pengembangan Metode Deteksi Penyakit Phenylketonuria)

Begum Fauziah

UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

## ABSTRAK

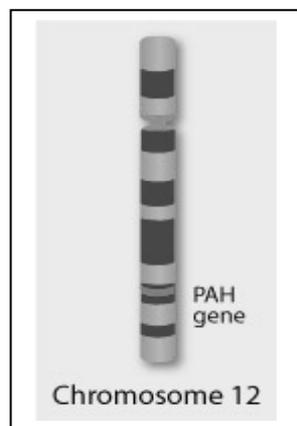
*The qualitative analysis of fenilalanin as paper chromatography and thin layer chromatography is developed as the beginning study of detection phenylketonuria disease. The result of identification qualitatively fenilalanin solution with concentration variation using paper chromatography media shows that the clearest spot is gotten by concentration minimal 50 ppm. The result of identification qualitatively fenilalanin solution with variation concentration 1, 3, 5, 10, 25 and 50 (ppm) using thin layer chromatography shows that from the smallest concentration that is 1 ppm, has already give the clear qualitative experiment result, that is purple. Fenilalanin analysis with thin layer chromatography gives more sensitive result than with paper chromatography. memberikan hasil yang lebih sensitif daripada dengan chromatography kertas.*

**Keywords :** fenilalanin, paper chromatography, thin layer chromatography

### A. PENDAHULUAN

Phenylketonuria atau PKU ialah suatu penyakit yang disebabkan karena seseorang tidak mampu merubah asam amino fenilalanin menjadi tirosin. Ketidakmampuan merubah asam amino fenilalanin menjadi tirosin disebabkan karena penderita tidak memiliki enzim fenilalanin hidroksilase (PAH) yang

berfungsi merubah asam amino fenilalanin menjadi asam amino tirosin. Fenilalanin yang bersumber dari protein makanan akan terakumulasi dan menyebabkan kekurangan tirosin. Fenilalanin yang berlebihan dapat dimetabolisme menjadi phenylketones (Suryo, 2005).



Gambar 1. Kromosom 12, pengode enzim PAH



Penentuan kadar fenilalanin dalam serum darah dapat dilakukan menggunakan kromatografi gas. Sampel dipreparasi dengan asam nitrit membentuk asam fenilaktat. Kemudian diekstraksi dengan eter dan diderivatisasi menggunakan bis(trimetilsilil)trifloroasetamida dalam suasana mild. Hasil derivatisasi dapat diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi gas. Metode ini memberikan hasil yang cukup baik namun preparasi cukup rumit (Shihabi, 1970).

Metode analisis fenilalanin serum dengan elektroforesis merupakan salah satu metode alternatif selain Kromatografi Cair dan Kromatografi Gas untuk diagnosa penyakit fenilketonuria. Instrumen elektroforesis yang digunakan sepanjang 65 cm, menggunakan 50 micron wide kapiler silika, fasa gerak yang digunakan 0.025 M asam borat (pH diatur sampai 10 dengan NaOH), detektor UV pada 214 nm. Efisiensi pemisahan untuk fenilalanin mencapai 150000 plate/kolom. Hasil penelitian menunjukkan linieritas 5-175 µg/ml, sensitivitas 3 µg/ml, koefisien korelasi 0,9998, dan koefisien variansi 4 %. Metode ini cukup memuaskan untuk analisis fenilalanin serum meskipun agak mahal (Tagliaro et al, 1994).

Sistem Flow Injection Analysis (FIA) dengan reaktor enzim termobilisasi digunakan untuk penentuan fenilalanin serum. Sampel serum dideproteinisasi dengan asam tungstat dan disaring dengan membran ultrafiltrasi. Sampel diinjeksi dengan fasa gerak akuades. NADH yang terbentuk dideteksi dengan florometri pada 465 nm. Kurva kalibrasi linier pada range konsentrasi 0,9-600 µm/l, dengan

limit deteksi 0,3 µm/l (Kiba, N., et al, 1997).

Metode florometri dan kolorimetri sudah mulai menggeser Guthrie Test untuk monitoring pasien fenilketonuria. Pengukuran Serum fenilalanin dilakukan dengan florometri dan diperoleh range konsentrasi antara 2-6 mg/dl. Pengukuran fenilalanin darah dengan filter paper dilakukan dengan kolorimetri enzimatis dan diperoleh range konsentrasi 4-10 mg/dl. Koefisien korelasi yang diperoleh 0,97 (Lemanska, D.T., et al, 2002).

Metode-metode tersebut diatas kurang sesuai untuk analisis klinis yang harus dilakukan secara kontinyu. Kelemahan deteksi Phenylketonuria (PKU) menggunakan uji serum darah adalah membutuhkan proses sampling yang lama dan melalui prosedur yang kompleks, preparasi sampel yang tidak mudah, harus dikerjakan oleh teknisi ahli dan didukung dengan instrumentasi yang memadai. Kendala yang muncul dalam proses sampling serum darah terjadi dikarenakan penderita PKU adalah bayi dan balita. Mengacu pada alasan tersebut, penelitian ini dilakukan guna mencari metode yang lebih efektif dan sederhana untuk penentuan fenilalanin yang harus dilaksanakan kontinyu bagi penderita atau carrier. Analisis fenilalanin dilakukan secara kromatografi kertas dan lapis tipis, yang kedepannya didesain untuk dapat dikembangkan pada sampel urine.

## **B. METODE PENELITIAN**

### **1. Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan adalah, Bejana pengembang untuk KK dan KLT, pipa kapiler, Labu takar, oven,

gelas piala, pipet tetes, mikro pipet, kertas saring, dan corong.

Bahan-bahan yang digunakan adalah asam amino standar fenilalanin PA (Sigma), larutan ninhidrin 0,2 % dalam aseton, plat KLT Silika, Kertas Whatman No 1, Butanol, Asam asetat, Akuades.

## 2. Prosedur Penelitian

### a. Preparasi

Larutan fenilalanin standar dibuat dalam konsentrasi 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm dalam pelarut air. Selanjutnya bejana pengembang kromatografi kertas diisi dengan fasa gerak campuran butanol: asam asetat : air ( 60 : 15 : 25) sebanyak 200 ml sedangkan bejana pengembang KLT diisi fasa gerak 50 ml. Bejana pengembang disimpan dalam kondisi tertutup minimal 2 jam. Plat KLT dengan ukuran 10 cm x 10 cm diberi garis dengan pensil 1 cm dari tepi bawah dan dibagi menjadi enam bagian. Kertas Whatman No 1 ukuran 20 x 20 cm diberi garis dengan pensil 3 cm dari tepi bawah dan dibagi menjadi enam bagian.

### b. Analisis fenilalanin Menggunakan Kromatografi Kertas

Kertas Whatman No 1 disiapkan, pada masing masing titik ditotolkan larutan fenilalanin 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm menggunakan pipa kapiler masing masing sebanyak 20 kali dan dibiarkan sampai mengering. Masukkan kromatografi kertas ke dalam bejana pengembang dan dijepit dibagian atas agar kertas bisa tegak lurus. Elusi kromatografi kertas sampai fasa gerak mencapai 3 cm dari batas atas, kemudian angkat dan dikeringkan. Kromatografi Kertas disemprot dengan larutan ninhidrin 0,2 % dengan hati hati. Masukkan kedalam oven dengan

suhu 80 C selama 15 menit sampai warna terbentuk. Beri tanda pada bagian/spot yang berwarna ungu, kemudian ukur jarak tempuh senyawa. Hitung nilai Rf-nya.

### c. Analisis fenilalanin Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Plat KLT disiapkan, pada masing masing titik ditotolkan larutan fenilalanin 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm menggunakan pipa kapiler masing masing sebanyak 200 µl dan dibiarkan sampai mengering. Masukkan plat KLT ke dalam bejana pengembang yang berisi fasa gerak campuran butanol: asam asetat : air ( 60 : 15 : 25) dan elusi KLT sampai fasa gerak mencapai 2 cm dari batas atas, kemudian angkat dan dikeringkan. KLT disemprot dengan larutan ninhidrin 0,2 % dengan hati hati. Masukkan kedalam oven dengan suhu 80 C selama 15 menit sampai warna ungu terbentuk. Beri tanda pada bagian/spot yang berwarna , kemudian ukur jarak tempuh senyawa. Hitung nilai Rf-nya.

## C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis merupakan metode analisis baik kualitatif atau kuantitatif yang dilakukan untuk mendeteksi ada atau tidaknya suatu senyawa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode terbaik untuk mendeteksi keberadaan senyawa fenilalanin pada sampel buatan dan sampel urine sehingga dapat diaplikasikan lebih lanjut untuk deteksi dini penyakit Phenylketonuria (PKU).

Penelitian ini meliputi analisis konsentrasi terkecil fenilalanin menggunakan kromatografi kertas menggunakan pereaksi ninhidrin,

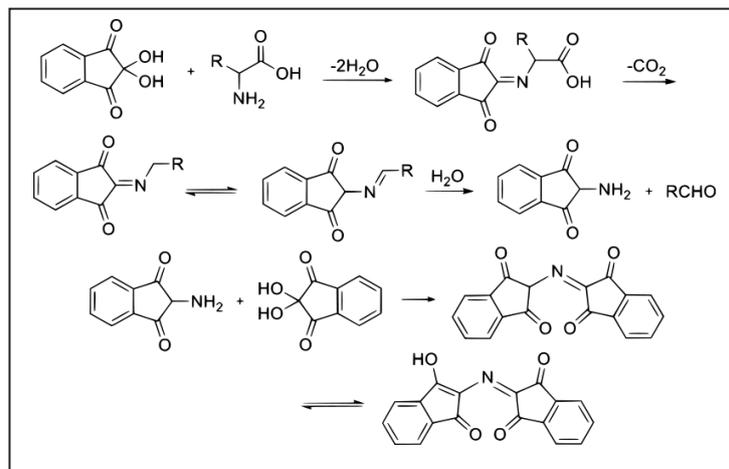
analisis konsentrasi terkecil fenilalanin menggunakan kromatografi lapis tipis.

### 1. Analisis Fenilalanin Menggunakan Kromatografi Kertas

Penelitian ini menggunakan kertas saring ukuran 20cm x 25cm sebagai media, fasa gerak campuran larutan butanol/asam asetat/akuades dengan komposisi 60:15:25. Pelaksanaan pemisahan dengan metode kromatografi kertas terbagi dalam tiga tahap yaitu tahap penotolan cuplikan, tahap pengembangan dan tahap identifikasi atau penampakan noda. Pada tahap penotolan cuplikan, mula – mula siapkan kertas kromatografi dengan ukuran 20cm x 25cm. Garis awal dibuat dengan jarak 3 cm dengan salah satu ujung kertas. Sampel yang digunakan adalah larutan fenilalanin dengan konsentrasi 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10

ppm, 25 ppm dan 50 ppm. Masing masing sampel dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 200 mikroliter dan ditotolkan atau pipa kapiler pada garis awal tadi kemudian keringkan.

Identifikasi senyawa asam amino dalam kromatografi kertas dilakukan menggunakan pereaksi ninhidrin. Ninhidrin merupakan hidrat dari triketon siklik, dan bila bereaksi dengan asam amino menghasilkan zat berwarna ungu. Ninhidrin merupakan suatu oksidator sangat kuat yang dapat menyebabkan terjadinya dekarboksilasi oksidatif asam  $\alpha$ -amino untuk menghasilkan  $\text{CO}_2$  dan  $2\text{NH}_3$  dan suatu aldehyd dengan satu atom karbon kurang daripada asam amino induknya. Reaksi gugus amino dengan ninhidrin menghasilkan senyawa jingga sesuai dengan gambar :



Gambar 3. Reaksi asam amino dan ninhidrin

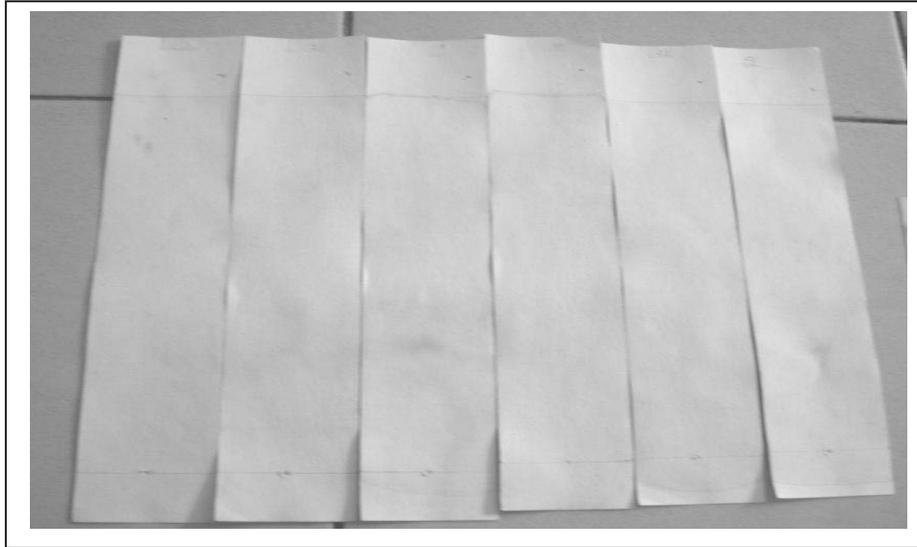
Noda berwarna jingga ditentukan harga  $R_f$ -nya. Besarnya  $R_f$  ini menyatakan derajat retensi suatu komponen dalam fasa diam. Harga

$R_f$  dihitung sebagai jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh eluen (fasa gerak).

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

## Analisis Kualitatif Fenilalanin Secara ...

Hasil analisis fenilalanin dengan menggunakan metode kromatografi kertas ditunjukkan pada gambar 4 dan tabel 1 berikut ini :



Gambar 4. Analisis fenilalanin menggunakan kromatografi kertas

Tabel 1. Hasil analisis fenilalanin menggunakan kromatografi kertas

konsentrasi (ppm)	ulangan 1		ulangan 2	
	Spot 1	Spot 2	Spot 1	Spot 2
1	tt	tt	0.30*	
3	tt	tt	0.30*	0.40*
5	tt	tt	0.30*	0.60*
10	tt	tt	0.30*	0.60*
25	tt	tt	0.30*	0.50*
50	0.30	0.49	0.26	0.50

Keterangan : tt= tidak tampak

\* = warna sangat lemah dan samar

Dari gambar 4 dan tabel 1 diketahui bahwa hasil identifikasi larutan fenilalanin pada berbagai konsentrasi menggunakan media kromatografi kertas hanya tampak jelas teramati secara jelas pada konsentrasi minimal 50 ppm. Larutan dengan konsentrasi dibawah 50 ppm tidak dapat teramati secara jelas bahkan tidak tampak sama sekali. Hal ini disebabkan kapasitas fasa diam yaitu molekul H<sub>2</sub>O yang teradsorpsi pada selulosa /kertas hanya mampu menahan sejumlah kecil molekul asam amino fenilalanin dari sampel. Apabila jumlah dari fenilalanin hanya sedikit maka ketika direaksikan dengan

ninhidrin tidak cukup untuk memberikan perubahan secara visual.

Nilai Rf adalah rasio jarak yang ditempuh oleh suatu zat terlarut terhadap jarak yang dipindahkan oleh garis depan pelarut selama waktu sama. Nilai Rf yang identik untuk suatu senyawa yang diketahui dan yang tidak diketahui dengan menggunakan beberapa sistem pelarut yang berbeda memberikan bukti yang kuat bahwa nilai untuk kedua senyawa tersebut adalah identik, terutama jika senyawa tersebut dijalankan secara berdampingan di sepanjang pita kertas yang sama Pada kasus yang sukses zat terlarut dari campuran

yang asli akan bergerak di sepanjang kertas dengan kecepatan yang berbeda-beda, membentuk sederetan noda yang terpisah. Pada tabel 4.1 diketahui pula bahwa nilai Rf yang teramati ada 2 yaitu 0,28 dan 0,495. Nilai Rf yang cukup konsisten dari beberapa ulangan adalah antara 0,25-0,30 sehingga identifikasi senyawa fenilalanin dengan fasa gerak campuran larutan butanol/asam asetat/akuades dengan komposisi 65:15:25 adalah pada Rf 0,28. Pelebaran spot yang terjadi dapat disebabkan oleh proses elusi yang menyebabkan media kertas sangat basah sehingga kertas tidak dapat tegak secara konsisten. Hal ini membuat proses distribusi senyawa fenilalanin pada fasa diam dan fasa gerak menjadi tidak stabil yang menyebabkan pelebaran area khas dari fenilalanin itu sendiri. Kekurangan kromatografi kertas selama ini adalah menjaga konsistensi dari media kertas. Ter bentuknya spot kedua diduga disebabkan oleh senyawa lain yang berbeda kepolaran dengan fenilalanin. Bentuk dari asam amino yang terhidrolisis menjadi kation menyebabkan spesies asam amino dapat satu senyawa lebih dari satu yaitu molekul fenilalanin, kation fenilalanin bahkan dimer fenilalanin.

## **2. Analisis Fenilalanin Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Dalam penelitian ini digunakan kromatografi lapis tipis dengan fasa diam silica. Plat KLT dipotong dengan ukuran 10 x 10 cm dan dibagi 6 dengan jarak masing-masing 1,6 cm. Jarak masing-masing sampel tidak boleh terlalu dekat karena dapat saling mengkontaminasi akibat dari pergerakan molekul sampel yang didorong oleh fasa gerak campuran

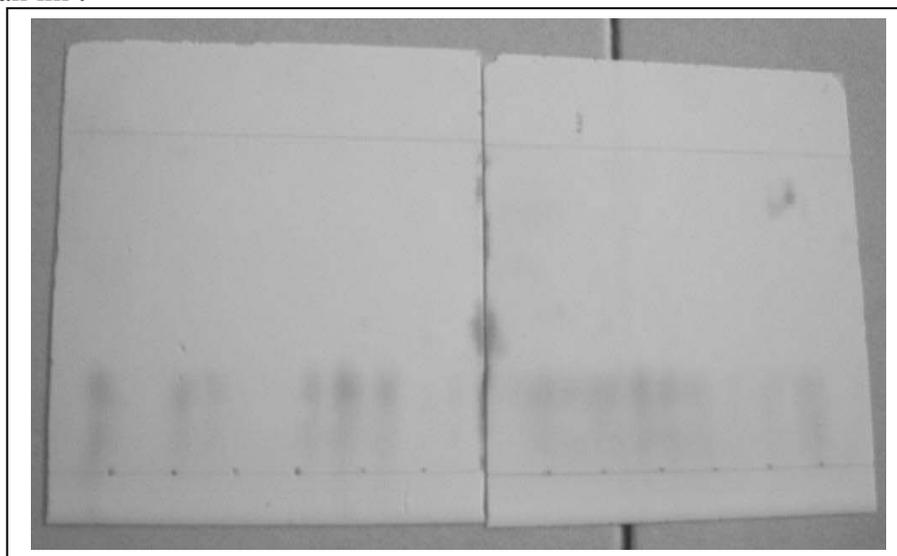
butanol: asam asetat : air ( 60 : 15 : 25). Jarak titik sampel dengan tepi bawah 1 cm dan dijaga agar fasa gerak tidak berinteraksi langsung dengan sampel. Apabila jarak tepi bawah terlalu kecil atau jumlah fasa gerak cukup banyak maka sampel akan bersentuhan dengan fasa gerak dan ada sebagian molekul sampel akan terlarut dalam fasa gerak. Hal ini menyebabkan hasil elusi pada kromatografi lapis tipis tidak valid. Sampel larutan fenilalanin dengan konsentrasi 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm dalam pelarut air ditotolkan di masing masing titik sampel pada lempeng kromatografi lapis tipis sebanyak 200 mikroliter ( $\mu$ l). Noda sampel dibuat sekecil mungkin agar tidak terjadi pelebaran area dari senyawa fenilalanin. Cara membuat noda yang kecil adalah dengan menotolkan menggunakan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan seterusnya. Sisi lempengan tersebut dicelupkan kedalam fasa bergerak yang sesuai. Pelarut bergerak naik di sepanjang lapisan tipis zat padat diatas lempengan, dan bersamaan dengan pergerakan pelarut tersebut, zat terlarut sampel dibawa dengan laju yang tergantung pada kelarutan zat terlarut tersebut data fase bergerak dan interaksinya dengan zat padat. Setelah garis depan pelarut bergerak hampir mendekati batas akhir, lempengan dikeringkan kemudian lempeng kromatografi lapis tipis disemprot dengan larutan ninhidrin 2 %. Ketika menyemprotkan larutan ninhidrin pada lempeng KLT harus dilakukan dengan hati hati pada posisi mendatar. Penyemprotan reagen dengan debit besar akan membuat pelebaran spot senyawa akibat tekanan zat cair reagen, demikian pula jika posisi dari plat

## Analisis Kualitatif Fenilalanin Secara ...

KLT miring atau tegak menyebabkan senyawa fenilalanin akan terdorong kebawah dari posisi semula akibat gaya gravitasi. Selanjutnya plat KLT dimasukkan kedalam oven dengan suhu 80 C selama 15 menit sampai warna terbentuk. Pengovenan dimaksudkan untuk mengeringkan

sisa pelarut baik dari fasa gerak atau reagen ninhidrin dan energi panas dapat mempercepat reaksi antara fenilalanin dan ninhidrin. Noda yang terbentuk berwarna jingga yang selanjutnya diidentifikasi nilai Rf nya.

Hasil analisis fenilalanin menggunakan KLT ditunjukkan dalam gambar dan tabel dibawah ini :



Gambar 5. Analisis fenilalanin menggunakan KLT dengan fasa gerak butanol: asam asetat : air ( 60 : 15 : 25)

Tabel 2. Hasil analisis fenilalanin menggunakan KLT dengan fasa gerak butanol: asam asetat : air ( 60 : 15 : 25).

konsentrasi (ppm)	ulangan 1		ulangan 2	
	Spot 1	Spot 2	Spot 1	Spot 2
1	0,25		0,25	
3	0,22		0,25	
5	0,25		0,25	
10	0,24		0,22	
25	0,24		0,22	
50	0,25	0,41	0,22	

Dari gambar 5 dan tabel 2 diketahui bahwa nilai Rf fenilalanin pada berbagai konsentrasi dan beberapa ulangan relatif sama dengan nilai Rf terkecil 0,22 dan Rf terbesar 0,25. Jika dibandingkan dengan nilai Rf pada kromatografi Kertas maka nilainya lebih kecil. Hal

ini disebabkan oleh kekuatan fasa diam yaitu silica gel dalam menahan senyawa fenilalanin lebih kuat daripada fasa diam senyawa air meskipun didorong oleh fasa gerak yang sama yaitu campuran butanol: asam asetat : air ( 60 : 15 : 25).

Pada KLT, fenilalanin dengan konsentrasi uji terkecil yaitu 1 ppm sebanyak 200  $\mu$ l dapat teramati secara visual dengan jelas yaitu berwarna jingga. Fenilalanin merupakan amina sekunder sehingga jika bereaksi dengan ninhidrin akan menghasilkan warna jingga. Jika dibandingkan dengan Kromatografi Kertas maka analisis menggunakan KLT lebih sensitif, hal ini terbukti pada konsentrasi 1 ppm sebanyak 200  $\mu$ l atau setara 0,2  $\mu$ g dapat teramati dengan jelas.

#### D. KESIMPULAN

Hasil identifikasi secara kualitatif larutan fenilalanin dengan variasi konsentrasi menggunakan media kromatografi kertas menunjukkan bahwa spot yang tampak jelas diperoleh pada konsentrasi minimal 50 ppm. Larutan fenilalanin dibawah konsentrasi 50 ppm tidak dapat teramati dengan jelas karena kapasitas fasa diam yaitu molekul air yang teradsorpsi pada selulosa kertas hanya mampu menahan sejumlah kecil molekul asam amino fenilalanin dari sampel. Akibatnya, penambahan reagen ninhidrin yang diberikan tidak cukup memberikan perubahan secara visual. Hasil identifikasi secara kualitatif larutan fenilalanin dengan variasi konsentrasi 1, 3, 5, 10, 25 dan 50 (ppm) menggunakan media kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa dari konsentrasi terkecil yaitu 1 ppm, sudah dapat memberikan hasil uji kualitatif dengan jelas yaitu berwarna jingga. Dengan demikian, penentuan fenilalanin menggunakan kromatografi lapis tipis lebih baik daripada kromatografi kertas.

#### E. UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga penelitian dan pengembangan UIN maliki Malang yang telah mendanai penelitian ini.

#### F. DAFTAR PUSTAKA

- Kiba, N, Itagaki, A and Furusawa, M, 1997, *Determination of l phenylalanine in serum by flow injection analysis using immobilized phenylalanine dehydrogenase and fluorometric detection*, Talanta, 44(1), 131-4
- Lemanska, D.T, Otarzewski, M and Kostyk, E, 2002, *Measurement of phenylalanine in blood on filter paper as method of monitoring PKU treatment*, Journal Medical Screen, 9, 64-66
- Shihabi, Z.K., and Summer, G.K., 1973, *Determination of Serum and Urinary Phenylalanine by Gas Chromatography*, Clinical Chemistry, 19/5, 496-498
- Suryo. 2005. *Genetika Manusia*. Yogyakarta: UGM Press
- Suryo. 2003. *Genetika Strata I*. Yogyakarta: UGM Press
- Tagliaro, F et all, 1994, *Capillary zone electrophoresis determination of phenylalanine in serum : a rapid, inexpensive and simple method for the diagnosis of phenylketonuria*, Journal Electrophoresis, 15(1), 94-7