

SKRIPSI

**ANALISIS STABILITAS THIOPIPERIN DALAM
PLASMA TIKUS DENGAN MENGGUNAKAN HPLC**

**STABILITY STUDIES OF THIOPIPERINE IN RAT
PLASMA USING HPLC**

Disusun dan diajukan oleh

SHAFHA HAURA SUHARTO

N011 17 1332



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**ANALISIS STABILITAS TIOPIPERIN DALAM PLASMA TIKUS DENGAN
MENGUNAKAN HPLC**

**STABILITY STUDIES OF THIOPIPERINE IN RAT PLASMA USING
HPLC**

SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

SHAFHA HAURA SUHARTO

N011 17 1332

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**ANALISIS STABILITAS TIOPIPERIN DALAM PLASMA TIKUS DENGAN
MENGUNAKAN HPLC**

SHAFHA HAURA SUHARTO

N011 17 1332

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,



Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt.

NIP. 1980101 200312 1 004

Pembimbing Pendamping,



Andi Dian Permana, M.Si., Ph.D., Apt.

NIP. 19890205 201212 1 002

Pada Tanggal, 24 JUNI 2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI
ANALISIS STABILITAS THIOPIPERIN DALAM PLASMA TIKUS DENGAN
MENGGUNAKAN HPLC
STABILITY STUDIES OF THIOPIPERINE IN RAT PLASMA USING
HPLC


Disusun dan diajukan oleh:

SHAFHA HAURA SUHARTO
N011 17 1332

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam
rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 24 JUNI 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt.
NIP. 1980101 200312 1 004

Pembimbing Pendamping,



Andi Dian Permana, M.Si., Ph.D., Apt.
NIP. 19890205 201212 1 002

Plt. Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19820610 200801 1 012

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini ;

Nama : Shafa Haura Suharto
Nim : N011 17 1332
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

**Analisis Stabilitas Tiopiperin dalam Plasma Tikus dengan menggunakan
HPLC**

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis benar benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 16 Juli 2021

Yang menyatakan,



Shafa Haura Suharto

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabiil 'alamiin segala puji bagi Allah *subhanahu wa ta'ala* yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, berupa kesehatan, kekuatan ilmu yang sempurna dan waktu yang begitu berharga sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi dan memperoleh gelar sarjana di Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak kesulitan yang dihadapi, dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dukungan dari berbagai pihak. Peneliti banyak menerima bimbingan, petunjuk dan bantuan serta dorongan dari berbagai pihak baik yang bersifat moral maupun material. Rasa syukur, ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya dan penghargaan setinggi - tingginya kepada:

1. Bapak Muhammad Aswad S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama dan Bapak Andi Dian Permana S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan bimbingan, arahan, saran, serta bantuan bagi penulis dalam melaksanakan penelitian dan senantiasa mengingatkan penulis untuk selalu berhati hati dan bekerja secara efisien selama penelitian dan melatih penulis untuk berpikir kritis dan logis dalam menyelesaikan suatu permasalahan.
2. Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt., dan Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt selaku penguji yang telah meluangkan waktunya dan

memberikan masukan dan saran terkait penelitian ini dan dalam proses menyelesaikan skripsi ini

3. Ibu Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt selaku pembimbing akademik yang telah membimbing selama proses menyelesaikan studi di fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
4. Seluruh Bapak/ Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmunya dan membimbing penulis selama masa studi S1 juga seluruh staf akademik dan segala fasilitas dan pelayanan yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh studi sehingga menyelesaikan penelitian ini.
5. Sahabat-sahabat penulis, Aisyah Andiani, Andi Nur Aulia El Firman, Asma Aris, Andi Dalauleng, Rusmainnah, Adelia Dwi Dayanti, Aprilia Holi Ta'bi, Sri Mailani, Elma Pebryna Putri, Geoni Malesso Todingan, Luthfiah Fitriyani Pelu untuk setiap dukungan, doa, dan semangat yang diberikan kepada penulis.
6. Rekan-rekan Korps. Asisten Kimia Farmasi yang senantiasa membantu dan memberikan dukungan kepada penulis.
7. Teman Teman LD Salsabil FF-UH untuk setiap dukungan, doa serta semangat yang diberikan kepada penulis
8. Teman-teman angkatan "CLOSTRI17IUM" atas kebersamaan yang kalian berikan selama penulis berada di bangku perkuliahan, melewati suka dan duka dalam perkuliahan dan berjuang untuk meraih mimpi masing masing
9. Ucapan terima kasih yang setulus-tulusnya khususnya kepada orang tua penulis yaitu Bapak Suharto Kasman dan Ibu Nuraeni dan

9. Ucapan terima kasih yang setulus-tulusnya khususnya kepada orang tua penulis yaitu Bapak Suharto Kasman dan Ibu Nuraeni dan keluarga penulis yang selalu memberikan dukungan, motivasi, kasih sayang, ridhonya serta doa yang tulus yang selalu mengiringi langkah penulis.

Penulis berharap agar skripsi ini dapat memberikan manfaat dalam sumbangsih ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang Farmasi dan dapat dijadikan acuan untuk mengembangkan penelitian penelitian selanjutnya

Makassar, 24 JUNI 2021



Shafa Haura Suharto

ABSTRAK

SHAFHA HAURA SUHARTO. Analisis Stabilitas Tiopiperin dalam Plasma Tikus Menggunakan HPLC (Dibimbing oleh Muhammad Aswad dan Andi Dian Permana).

Tiopiperin adalah senyawa turunan dari piperin yang telah berhasil disintesis dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat baru karena memiliki aktivitas sebagai antikanker dan antiinflamasi. Dalam pengembangannya, khususnya dalam pengujian farmakokinetik, dibutuhkan suatu metode analisis yang tervalidasi untuk menganalisis senyawa tiopiperin dalam plasma darah menggunakan HPLC. Salah satu pengujian yang dilakukan dalam validasi metode analisis adalah pengujian stabilitas. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi stabilitas dari tiopiperin dalam plasma darah selama proses analisis terhadap berbagai kondisi penyimpanan dan perlakuan. Adapun pengujian stabilitas yang dilakukan meliputi stabilitas *autosampler*, stabilitas *bench-top*, stabilitas *long-term*, dan stabilitas *freeze-thaw*. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan kolom Xselect CSH™ C18 (Waters, 3,0 x 150 mm, 3,5 µm) dengan fase gerak Asetonitril : Air (60:40 v/v) dengan laju alir 0,5 mL/menit. Deteksi dilakukan dengan menggunakan Detektor PDA pada panjang gelombang 340 nm dan volume penyuntikan 20 µL dan dilakukan ekstraksi menggunakan metanol dengan perbandingan (1:3) dengan prinsip pengendapan protein. Hasil yang diperoleh pada pengujian stabilitas *autosampler*, *bench-top*, *long term* dan *freeze-thaw* untuk nilai %RE dari konsentrasi rendah dan tinggi masing masing sebesar 8,31±5,97 dan 7,20±6,03; 5,43±4,94 dan 7,60±6,94; 10,05±3,24 dan 3,12±2,37; 12,47±5,80 dan 9,04±5,84. Pada semua pengujian stabilitas didapatkan nilai %RE yang memenuhi persyaratan yaitu ±15%. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa tiopiperin stabil didalam plasma darah dalam kondisi pengujian dan penyimpanan yang dilakukan selama proses analisis.

Kata Kunci : HPLC, Plasma Tikus, Stabilitas, Tiopiperin

ABSTRACT

SHAFHA HAURA SUHARTO. Stability Studies of Thiopiperine in Rat Plasma Using HPLC (Supervised by Muhammad Aswad and Andi Dian Permana).

Thiopiperine is a derivative of piperine that has been successfully synthesized and potentially to be developed as a new drug due to its anticancer and anti-inflammatory activity. In drug development especially in pharmacokinetics study, a validated analytical method is needed to analyze thiopiperine in blood plasma using HPLC. One of the test in validation of analytical method is stability testing. The purpose of this study was to evaluate the stability of thiopiperine in blood plasma were exposed to various storage and treatment condition during analysis. The stability studies such are autosampler stability, bench-top stability, long-term stability, and freeze-thaw stability. Chromatography analysis was achieved using Xselect CSHTM C₁₈ column (Waters[®], 3.0 x 150 mm, 3.5 μm) with a mobile phase of Acetonitrile: Water (60:40 v / v) with a flow rate of 0.5 mL / minute. Detection system was performed using a PDA Detector at a wavelength of 340 nm and an injection volume of 20 μL and extraction was carried out using methanol with a ratio (1: 3) of extraction with the protein precipitation method. The results obtained in the autosampler, bench-top, long-term and freeze-thaw stability tests for the %RE values of low and high concentrations were respectively, 8.31±5.97 and 7.20±6.03; 5.43±4.94 and 7.60±6.94; 10.05±3.24 and 3.12±2.37; 12.47±5.80 and 9.04±5.84. In all stability tests, the %RE value that meets the requirements is ± 15%. From these results it can be concluded that thiopiperine was stable in blood plasma under various treatment and storage conditions during analysis.

Keywords: HPLC, Rat Plasma, Stability, Thiopiperine

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	5
I.3 Tujuan Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1 Tiopiperin	6
II.2 HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	7
II.3 Plasma Darah	17
II.4 Metode Bioanalisis	18
II.5 Parameter Stabilitas Dalam Validasi Metode Bioanalisis	23
BAB III METODE PENELITIAN	28
III.1 Alat dan Bahan	28
III.2 Uji Kesesuaian Sistem	28
III.3 Preparasi Larutan Stok dan Larutan <i>Quality Control</i>	29

III.4 Uji Stabilitas	30
BAB IV Hasil Dan Pembahasan	32
IV.1 Uji Kesesuaian Sistem	32
IV.2 Penetapan konsnetrasi larutan <i>Quality Control</i>	33
IV.3 Pengujian Stabilitas	35
BAB V PENUTUP	37
V.1 Kesimpulan	37
V.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil pengujian parameter uji kesesuaian sistem	33
2. Hasil pengujian regresi linear kurva kalibrasi, LOD dan LOQ	35
3. Hasil Pengujian stabilitas tiopiperin dalam plasma tikus	35
4. Data Pengukuran Nilai LOD dan LOQ	61
5. Data Pengukuran Hasil Pengujian Stabilitas	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Stuktur Senyawa Tiopiperin	3
2. Diagram skematik dari instrument HPLC	15
3. Skema Ekstraksi dengan prinsip pengendapan protein	20
4. Skema Ekstraksi dengan prinsip <i>Liquid Liquid Extraction</i>	22
5. Skema Ekstraksi dengan prinsip <i>Solid Phase Extraction</i>	23
6. Diagram Kurva Kalibrasi Tiopiperin	34
7. Tiopiperin	45
8. Plasma Tikus	45
9. Larutan <i>Quality Control</i>	45
10. Tiopiperin dalam plasma setelah diekstraksi dengan metanol	45
11. Timbangan Analitik	45
12. Vortex	45
13. Alat Sentrifugasi	46
14. Sonikator	46
15. Freezer	46
16. Kolom KCKT	46
17. Alat <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)	46

DAFTAR SINGKATAN

C	= Karbon
HPLC	= <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HETP	= <i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i>
KCKT	= Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
mm	= millimeter
NF-kB	= <i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
nm	= nanometer
O	= Oksigen
PDA	= <i>Photo Diode Array</i>
RSD	= <i>Relative Standar Deviation</i>
RE	= <i>Relative error</i>
S	= Sulfur
SPE	= <i>Solid Phase Extraction</i>
UV	= Ultra Violet
Vis	= <i>Visible</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema kerja	42
2. Dokumentasi Penelitian	45
3. Data Kromatogram HPLC	47
4. Perhitungan	59
5. Surat Rekomendasi Persetujuan Etik	64

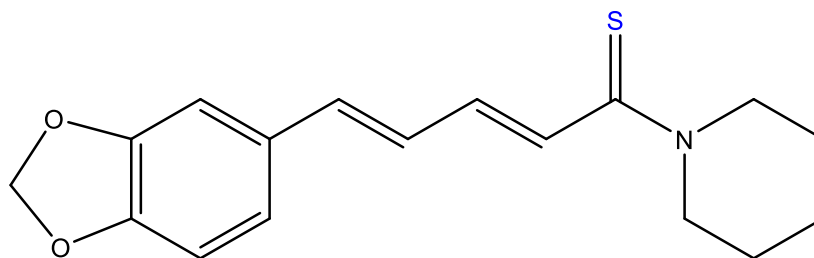
BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Piperin merupakan senyawa aktif pertama yang berhasil diisolasi dari tanaman dengan famili *Piperaceae* dan terbukti memiliki beberapa aktivitas farmakologis (Shityakov *et al.*, 2019). Beberapa penelitian terkait dengan aktivitas farmakologis dari piperin telah melaporkan adanya efek antioksidan (Bracke *et al.*, 2018), anti karsinogenik (Tharmalingam *et al.*, 2014) , anti inflamasi, (Tasleem *et al.*, 2014), dan aktivitasnya dalam meningkatkan bioavaibilitas dari beberapa obat (Bedada and Boga, 2017). Saat ini telah dikembangkan beberapa penelitian untuk melakukan modifikasi stuktur dari senyawa piperin dengan menerapkan prinsip bioisosterisme untuk menghasilkan senyawa turunan yang memiliki aktivitas farmakologis yang lebih efektif dibandingkan dengan senyawa piperin tanpa mengubah stuktur kimia dari piperin secara signifikan (Gaikwad *et al.*, 2012). Salah satunya adalah senyawa tiopiperin. Tiopiperin merupakan senyawa derivat dari piperin yang mengalami modifikasi berupa substitusi atom Oksigen (O) dengan atom Sulfur (S) pada gugus karbonil (C=O) dalam stuktur piperin. Penelitian yang dilakukan oleh (Sukmana, 2018) menunjukkan adanya aktivitas dari senyawa tiopiperin terhadap enzim siklooksigenase-2 (COX-2) pada uji prediksi *in silico* yang ditunjukkan dari nilai energi ikatan yang lebih besar

jika dibandingkan dengan piperin. Penelitian lain yang dilakukan oleh (Aswad *et al.*, 2020), Tiopiperin juga memiliki potensi sebagai anti kanker dengan mekanisme sebagai inhibitor kuat dalam proses aktivasi dari NF- κ B pada sel kanker payudara. Berdasarkan beberapa aktivitas tersebut, maka tiopiperin berpotensi untuk dikembangkan menjadi kandidat obat baru. Sebagai langkah awal dalam tahapan pengembangan kandidat obat maka dilakukan uji praklinik dengan menggunakan metode *in vitro* dan *in vivo*. Sebelum melakukan pengujian kinerja obat dalam *in vivo* maka perlu dilakukan uji validasi metode bioanalisis terhadap senyawa tiopiperin dalam plasma darah.



Gambar 1. Struktur senyawa Tiopiperin

Bioanalisis merupakan metode analisis yang digunakan untuk menggambarkan pengukuran kuantitatif senyawa (obat) atau metabolitnya dalam cairan biologis, seperti darah, plasma, serum, urin atau ekstrak jaringan. Metode bioanalisis digunakan dalam melakukan evaluasi dan interpretasi hasil pada uji farmakokinetik, bioavailabilitas, bioekivalensi dan toksikokinetik dari obat atau metabolit obat (Pandey *et al.*, 2010). Salah satu faktor penting dalam prosedur validasi metode bioanalisis, adalah uji evaluasi terhadap stabilitas obat dan metabolit obat dalam matriks biologis seperti plasma darah. Uji stabilitas obat bertujuan untuk mengetahui

pengaruh stabilitas sampel/analit terhadap berbagai kondisi penyimpanan tertentu (Van De Merbel *et al.*, 2014). Berbagai kondisi penyimpanan tersebut meliputi penyimpanan selama proses pembekuan dan pencairan, penyimpanan dalam ruang analisis, dan penyimpanan dalam alat/ instrument selama proses analisis. Hal ini menjadi proses yang krusial karena terdapat kemungkinan bahwa obat yang dianalisis tidak stabil di bawah penyimpanan, kondisi, atau perlakuan tertentu yang mengakibatkan degradasi/kehilangan jumlah obat sebelum dianalisis yang menyebabkan ketidakakuratan hasil penentuan kadar yang diperoleh (Briscoe and Hage, 2009). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya telah dilaporkan beberapa obat yang tidak stabil didalam plasma darah. Penelitian yang dilakukan oleh (Wang *et al.*, 2007) Senyawa asam kafeat fenetil ester dan derivat fluorinasinya mengalami degradasi hingga 80% dalam plasma darah tikus pada pengujian stabilitas *short-term* setelah disimpan dalam suhu 4°C, 25 °C dan 37 °C selama 24 jam. Penelitian lain yang dilakukan oleh (Pan *et al.*, 2017), Senyawa arecoline mengalami degradasi dalam plasma sekitar 15% setelah 12 jam disimpan pada suhu ruang. Berdasarkan penelitian tersebut bahwa tidak semua molekul obat stabil didalam plasma. Oleh karena itu, perlu untuk mengetahui stabilitas tiopiperin dalam plasma darah.

Dalam melakukan metode bioanalisis obat dalam plasma digunakan instrument RP-HPLC. Metode ini memiliki kemampuan untuk menganalisis sampel dengan rentang polaritas yang berbeda, selektif, memiliki

sensitivitas yang tinggi dengan batas deteksi yang rendah, dan preparasi sampel yang mudah (Kirthi *et al.*, 2014; Moldoveanu and David, 2017). Dalam validasi pengembangan metode bionalisis, dilakukan uji stabilitas terhadap sampel matriks biologis seperti plasma darah meliputi uji stabilitas *autosampler, bench-top (short-term), extract or processed, freeze-thaw, long-term, dan stock solution*. (Food and Drug Administration, 2018). Sampai saat ini, Belum ada penelitian yang dilaporkan terkait dengan data stabilitas dari senyawa tiopiperin dalam plasma darah dengan menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Pengujian stabilitas dalam validasi metode bioanalisis menjadi faktor yang penting dalam melakukan interpretasi hasil pada uji farmakokinetik, farmakodinamika dan bioekivalensi dari obat.

Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukanlah penelitian mengenai uji Stabilitas senyawa tiopiperin turunan piperin dalam sampel plasma darah tikus dengan HPLC.

1.1 Rumusan Masalah

Bagaimana stabilitas dari senyawa tiopiperin dalam plasma darah tikus dengan menggunakan HPLC?

1.2 Tujuan Penelitian

Untuk mengevaluasi stabilitas dari senyawa tiopiperin dalam plasma darah tikus dengan menggunakan HPLC

BAB II

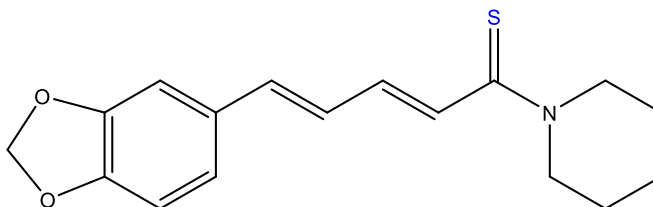
TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tiopiperin

Tiopiperin merupakan senyawa turunan piperin yang mengalami modifikasi stuktur berupa substitusi atau penggantian gugus karbonil (C=O) dengan gugus tiokarbonil (C=S) pada stuktur piperin. Tiopiperin memiliki pemerian berupa serbuk berwarna oranye, memiliki bau khas sulfur. Tiopiperin larut dalam metanol, aseton, dan kloroform tetapi agak sukar larut dalam air. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Sukmana, 2018) Tiopiperin berhasil disintesis dari senyawa induk piperin dengan menggunakan pereaksi Lawesson sebagai agen tionasi dan tetrahidrofuran sebagai pelarut dengan memberikan *%yield* sebesar 85,64%.

Beberapa penelitian telah melaporkan adanya aktivitas farmakologis dari tiopiperin. Berdasarkan Penelitian yang dilakukan oleh (Sukmana, 2018) Tiopiperin menunjukkan adanya aktivitas terhadap enzim siklooksigenase-2 (COX-2) pada uji prediksi *in silico* yang dilakukan yang ditunjukkan dari nilai energi ikatan yang lebih kuat jika dibandingkan dengan piperin dan asam arakhidonat sebagai senyawa pembanding yang telah terbukti aktivitasnya. Dalam penelitian yang yang dilakukan oleh (Aswad *et al.*, 2020). Tiopiperin juga memiliki potensi sebagai anti kanker

dengan mekanisme sebagai inhibitor kuat dalam proses aktivasi dari faktor transkripsi NF- κ B pada sel kanker payudara.



Gambar 1. Struktur senyawa tiopiperin

II.2 HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

II.2.1 Pendahuluan

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) atau biasa juga disebut Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu teknik pemisahan analit/senyawa berdasarkan kepolarannya dengan menggunakan fase gerak cair yang dialirkan melalui kolom (fase diam) dengan menggunakan bantuan tekanan. Dengan memberikan tekanan tinggi, akan meningkatkan laju dan efisiensi pemisahan. Adapun keunggulan metode HPLC dengan metode analisis yang lain yaitu berada pada akurasi dan kepekaan yang tinggi dengan batas deteksi yang rendah serta cocok untuk memisahkan senyawa-senyawa yang bersifat termolabil atau tidak tahan terhadap pemanasan yang tinggi. Peningkatan akurasi dan efisiensi pemisahannya didasarkan atas peningkatan performa dari kolom (fase diamnya) (Susanti and Dachriyanus, 2011)

Prinsip Pemisahan yang terjadi dalam HPLC didasarkan atas adanya solut atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi.