



PENENTUAN WAKTU MATI MEMANFAATKAN DERET HOMOLOG ALKILPARABEN PADA RP-HPLC DALAM SISTEM PELARUT METANOL/AIR

Mahmudi¹⁾, Saiful²⁾, Khairan³⁾ dan Rinaldi Idroes^{*3)}

¹⁾ Magister Kimia Universitas Syiah Kuala.

²⁾ Jurusan Kimia FMIPA Universitas Syiah Kuala.

³⁾ Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Syiah Kuala.

Email : rinaldi.Idroes@unsyiah.ac.id

Abstrak : Penelitian ini dalam rangka pengembangan dan aplikasi metode penentuan waktu mati (t_0) pada Kromatografi Cair dari yang telah pernah dan berhasil diterapkan di GC. Waktu mati merupakan parameter yang sangat penting untuk penentuan parameter lain seperti Faktor kapasitas (k'), retensi relative (t_R') dan indeks retensi kovats (IR), sehingga didapat hasil berupa data base yang bisa diterapkan dalam instrumentasi GC dan RP-HPLC. Penentuan waktu mati dengan menggunakan dua metode yaitu metode iterasi dan metode linearisasi, sehingga didapat nilai indeks retensi kovats dari senyawa uji pada sistem RP-HPLC dengan menggunakan deret homolog alkilparaben. Hasil penelitian menunjukkan deret homolog alkilparaben terbukti dapat digunakan untuk penentuan indeks retensi Kovats dalam RP-HPLC dengan koefisien korelasi yang sangat baik terutama pada sistem pelarut MeHO/H₂O (90:10).

Keywords : RP-HPLC, waktu mati, indeks retensi, deret homolog

I. PENDAHULUAN

Pemanfaatan indeks retensi pertama kali diperkenalkan oleh E. Kovats (Kovats, 1958) pada sistem *Gas Chromatography* (GC), akan tetapi dalam sistem *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) indeks retensi Kovats belum dapat diaplikasikan, ini disebabkan tingginya sensitifitas dari parameter waktu retensi (t_R) terhadap perubahan fasa diam, suhu, pH, komposisi fasa gerak dan laju alir (Waetzig, 1989). Indeks retensi suatu senyawa dihitung relatif terhadap dua senyawa standar sehingga pengaruh instrumen dapat diabaikan dan presisi dapat ditingkatkan. Waktu mati (t_0) juga merupakan komponen penting dalam penentuan indeks retensi (Didaoui, 1996). Penentuan waktu mati tergantung pada sistem kromatografi itu sendiri, artinya belum ada suatu kesepakatan antar peneliti dalam mendefinisikan makna hakiki waktu mati. Penentuannya selalu tergantung pada metode yang digunakan (Waetzig, 1989). Dalam rangka mengembangkan suatu besaran yang mempunyai keberulangan tinggi, maka sejak

tahun 1979 telah dimulai penelitian indeks retensi pada HPLC sesuai prinsip yang telah dilakukan pada GC yang dipopulerkan oleh Kovats (Ettre, 2003; Harangi, 2003). Beberapa deret homolog yang telah diteliti antara lain Polycyclic aromatic hydrocarbon (Popl, *et al.*, 1974), Alkilarilketon (Kikta, 1977), 2-Alkanone (Baker, 1979), Alkilbenzen (Morishita, *et al.*, 1984), 1-Nitroalkan (Bogusz, 1988), Paraban (Yamauchi, 1993) dan 1-(*p*-(2,3-dihidroksipropoksi)fenil)-1-alkanon (Kuronen, 1991).

Indeks Retensi Kovats, yaitu indeks retensi berbasis *n*-alkana sebagai standar, pada Kromatografi Gas telah diaplikasikan secara luas oleh para analis kimia, karena lebih *reliable* dan *reproducible* dibanding waktu retensi (t_R) dan faktor retensi/kapasitas (k'), hal ini disebabkan karena Indeks Retensi Kovats tidak sensitif terhadap perubahan kolom, panjang kolom, diameter kolom, gas pembawa, laju alir, pre kolom, dan terhadap sedikit perubahan terhadap kondisi eksperimen lainnya, bila dibandingkan dengan waktu retensi dan faktor kapasitas. Oleh karena itu banyak riset-riset untuk pengembangan dan

aplikasi indeks retensi Kovats dalam kromatografi telah dilakukan terutama aplikasi yang telah meluas dalam Kromatografi Gas (Idroes, 2002).

Pengembangan dan aplikasi Indeks Retensi Kovats dalam Kromatografi Cair terutama RP-HPLC terkendala karena *n*-alkana sebagai standar tertahan lebih lama didalam kolom RP-HPLC, sehingga dalam aplikasi analisa rutin menjadi sangat tidak efektif dan efisien. Selain itu aplikasi dalam Kromatografi Cair juga terkendala mekanisme interaksi yang terjadi pada Kromatografi Cair itu sendiri yang lebih rumit dan kompleks dibanding yang terjadi pada Kromatografi Gas. Pada Kromatografi Gas interaksi utama yang terjadi hanya antara zat terlarut dengan kolom, sedangkan pada Kromatografi Cair terjadi tiga macam interaksi sekaligus, yaitu antara zat terlarut dengan kolom, zat terlarut dengan fasa gerak dan fasa gerak dengan kolom (Idroes, 2010).

Penelitian indeks retensi telah dikembangkan sebagai suatu ide, sehingga apabila indeks retensi pada RP-HPLC dapat digolongkan sebagai Indeks Retensi Kovats, dengan menghubungkan antara sifat *n*-alkana dan deret-deret homolog (Idroes, 2002). Penelitian sebelumnya telah diteliti dengan menguji dan memilih beberapa deret homolog untuk dihubungkan dengan *n*-alkana sebagai standar yaitu 2-alkanon (Idroes, 2005), alkilbenzena (Idroes, 2008), dan alkilarilketon (Idroes, 2010). Dari ketiga deret homolog tersebut tidak ada yang seratus persen memenuhi kriteria yang ideal, yang terbaik adalah 2-alkanon dengan kriteria ideal sekitar 85%, kemudian alkilbenzena 75% dan terakhir alkilarilketon 65%. Walaupun 2-alkanon terbaik diantara ketiga deret homolog tersebut, akan tetapi beberapa deret homolog dari 2-alkanon dengan rantai alkil yang lebih pendek menunjukkan sifat yang tidak terlalu ideal, hal ini juga disebabkan waktu retensi yang relatif singkat akibat kurang tertahan dikolom, sehingga kromatogramnya kadang *overlap* dengan waktu retensi pelarut itu sendiri. Sedangkan pada deret homolog alkilbenzen beberapa deret homolog dengan rantai alkil yang lebih pendek menunjukkan kecenderungan efek sterik. Pada deret homolog alkilarilketon, pada komposisi pelarut yang berbeda bahkan menunjukkan sifat deret homolog yang kurang stabil untuk bisa digunakan sebagai *reference* begitu juga dengan linearitas antara faktor kapasitas terhadap bilangan atom karbon rantai alkil yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan

deret homolog 2-alkanon dan alkilbenzena. Untuk itu dirasa perlu untuk mengeksplorasi deret homolog lainnya (Idroes, 2010).

II. METODOLOGI

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah RP-HPLC, Kolom: WATERS Sunfire C18 *made in Ireland*, diameter 5 μ m, 150 x 4,6 mm serial 01203619113645, *Coloumn heater* model 7981 KNAUER, Pompa: HPLC Pump K-1001 WellChrom KNAUER. *Detektor Refractive Index* (Indeks Bias) model RI-2000 KNAUER, syringe. Bahan yang digunakan adalah Senyawa deret homolog Alkilparaben adalah Metilparaben hingga Butilparaben, Pelarut yang digunakan adalah air, methanol for HPLC.

Deret homolog Alkilparaben adalah Metilparaben hingga Butilparaben (SIGMA) 25 ppm diinjeksikan dalam HPLC. Pelarut yang digunakan adalah air, methanol for HPLC, pada sistem beberapa komposisi pelarut. Gas pada pelarut dihilangkan dengan menggunakan Auto Degasser KNAUER, yang terhubung *on-line* antara pelarut dan pompa. Supaya tercapai kondisi kesetimbangan pada sistem, maka peralatan HPLC dan detektor dihidupkan terlebih dahulu lebih kurang selama 30 menit, baru dilakukan penyuntikan. Kondisi eksperimen sebagai berikut. Kolom: WATERS Sunfire C18 *made in Ireland*, diameter 5 μ m, 150 x 4,6 mm serial 01203619113645, *Coloumn heater* model 7981 KNAUER. Sistem ISOKRATIK dengan dua pompa. Laju alir: 1,0 ml/menit. Pompa: HPLC Pump K-1001 WellChrom KNAUER. *Detektor Refractive Index* (Indeks Bias) model RI-2000 KNAUER, suhu diatur pada 30 °C. *Optical Balance* < 50%, signal \pm 75,0 mV, Detektor UV KNAUER K-2501, Rekorder KNAUER, Jarak tubing dari injektor – kolom 60 cm, kolom – detektor 22 cm. Waktu mati dan Indeks Retensi dihitung dengan menggunakan metode iterasi dan linearisasi.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Fokus utama dalam penelitian ini adalah mempelajari sifat dari deret homolog alkilparaben terhadap perolehan waktu mati dan nilai indeks retensi. Umumnya pada penelitian HPLC, hal utama yang harus dilakukan adalah mempelajari komposisi pelarut yang paling tepat sehingga bisa diaplikasikan secara bersamaan dalam

mengukur data deret homolog alkilparaben. Pengukuran dilakukan pada komposisi pelarut yaitu sistem metanol: air (90 : 10). Sistem yang dapat menghasilkan data retensi untuk perhitungan waktu mati dan indeks retensi yang akurat terhadap alkilparaben akan digunakan untuk mempelajari hubungan linieritas deret homolog tersebut sehingga bisa diaplikasikan untuk menghitung indeks retensi senyawa uji. Dalam mengukur perolehan waktu mati dan keakuratan indeks retensi digunakan metode iterasi dan linierisasi.

Diperoleh nilai waktu mati yang sangat baik terlihat dari koefisien korelasi sebesar 0,996. Nilai IR dilakukan dengan menghitung selisih nilai benar dari indeks retensi dengan nilai indeks rentensi hitung pada penelitian ini. Jika selisihnya mendekati 0 maka indeks retensi tersebut tingkat keakuratan sangat baik. Nilai indeks retensi yang diperoleh dari penelitian ini sangat baik dimana terlihat nilai IR nilai indeks retensi hitung dengan nilai indeks retensi fiktif lebih kecil dari 15% sehingga semakin kecil nilai IR maka perolehan indeks retensi semakin akurat. Selisih indeks retensi alkilparaben pada penelitian ini paling besar 14.365. Dari perolehan waktu mati dan indeks retensi tersebut, maka data ini bisa digunakan sebagai standar sekunder penentuan indeks retensi senyawa uji.

Tabel 1 memperlihatkan hasil perhitungan waktu mati dan indeks retensi deret homolog alkilparaben menggunakan metode iterasi pada sistem metanol: air (90:10) diperoleh waktu mati sebesar 1.758 menit. Nilai waktu mati ini berada dibawah semua nilai waktu retensi dari senyawa deret homolog alkilparaben.

Tabel 1. Hasil perhitungan Waktu Retensi dan Indeks Retensi secara Iterasi deret homolog alkilparabenmulai metilparaben sampai butilparaben menggunakan sistem pelarut MeOH/H₂O (90:10)

n_c	waktu Retensi	Indeks Retensi	t_R'	k'	IR
8	1.808	802.133	0.050	0.028	2.133
9	1.850	889.679	0.092	0.052	-10.321
10	1.978	1014.365	0.220	0.125	14.365
11	2.142	1093.876	0.384	0.218	-6.124
Waktu mati	1.758				
Koefisien Korelasi	0.996				
Slope	0.007				
Intersep	-8.635				

Tabel 2. Hasil perhitungan Waktu Retensi dan Indeks Retensisecara Linierisasi deret homolog alkilparaben mulai Metilparaben sampai Butilparaben menggunakan sistem pelarut MeOH/H₂O (90:10)

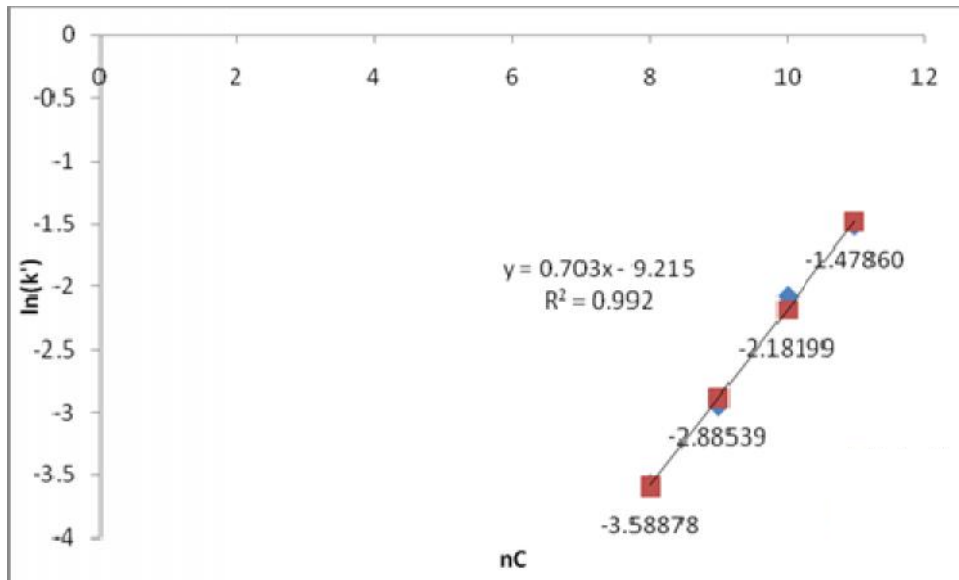
n_c	waktu Retensi	Indeks Retensi	t_R'	k'	IR
8	1.808	945.318	0.136	0.081	145.318
9	1.850	983.866	0.178	0.106	83.866
10	1.978	1061.337	0.306	0.183	61.337
11	2.142	1122.618	0.470	0.281	22.618
Waktu mati	1.672				
Koefisien Korelasi	0.977				
Slope	0.007				
Intersep	-8.635				

Tabel 3. Data retensi hubungan n_C dengan $\ln(k')$ deret homolog alkilparaben

n_C	k'	$\ln(k')$	$y(\text{calc})$	$y-(b+mx)$
8	0.028	-3.5756	-3.58878	0.01323
9	0.052	-2.9565	-2.88539	-0.07112
10	0.125	-2.0794	-2.18199	0.10255
11	0.218	-1.5233	-1.47860	-0.04466

Tabel 4. Parameter regresi plot antara n_C terhadap $\ln(k')$ deret homolog alkilparaben

Parameter Regresi	Nilai	Parameter Regresi	Nilai
Slope	0.70339	Sdv regression	0.09419
Sdv slope	0.04213	F statistic	278.816
Intercept	-9.21594	Stat var	2
Sdv intersept	0.40295	Ss regression	2.47382
Coeff determn	0.99288	Ss residuals	0.01775



Gambar 1. Grafik hubungan linear antara n_C dengan $\ln(k')$ deret homolog alkilparaben

Tabel 2 hasil perhitungan waktu mati dan indeks retensi deret homolog alkilparaben menggunakan metode linearisasi pada sistem metanol: air (90:10). Pada kondisi ini diperoleh waktu mati sebesar 1.672 menit dengan koefisien korelasi sebesar 0,977. Hal ini menunjukkan perolehan nilai waktu mati yang sangat baik terlihat dari nilai koefisien korelasi yang mendekati 1 dan nilai waktu mati yang lebih kecil dari waktu retensi metilparaben. Namun Hal ini tidak diikuti oleh perolehan nilai indeks retensi dimana terlihat nilai IR

nilai indeks retensi hitung dengan nilai indeks retensi fiktif lebih besar dari 15%. Dimana semakin besar nilai IR maka perolehan indeks retensi semakin tidak akurat. Selisih Indeks retensi alkilparaben pada kondisi ini semuanya lebih besar dari 15 yaitu mulai 22,618 sampai 145,314. Dari perolehan waktu mati dan indeks retensi tersebut maka data ini tidak bisa digunakan sebagai standar sekunder penentuan indeks retensi senyawa uji. Hasil perhitungan waktu mati dan indeks retensi kedua deret homolog pada sistem metanol: air

(90:10) menunjukkan bahwa perhitungan dengan menggunakan metode iterasi memberikan data yang sangat baik dan bisa digunakan sebagai standar yaitu deret homolog n-alkana sebagai standar primer dan alkilparaben sebagai standar sekunder. Sedangkan perhitungan dengan metode linearisasi memberikan data yang baik untuk standar primer deret homolog n-alkana namun tidak memberikan data yang baik untuk standar sekunder deret homolog alkilparaben karena perolehan indeks retensi yang tidak akurat. Maka dari itu data retensi yang dihitung dengan metode iterasi akan digunakan untuk perhitungan lanjutan untuk menguji hubungan linieritas antara kedua deret homolog tersebut untuk bisa digunakan sebagai standar perhitungan senyawa uji.

Gambar 1 dan Tabel 4, dapat dilihat hubungan yang linear antara bilangan karbon terhadap nilai $\ln(k')$ alkilparaben. Hubungan linear tersebut ditunjukkan dari nilai-nilai parameter regresi yang dihasilkan dari hasil plot garis antara n_C terhadap nilai $\ln(k')$ alkilparaben. Nilai koefisien determinasi (koefisien korelasi) yang diperoleh sebesar 0,992. Ini menunjukkan nilai yang sangat bagus karena nilai ini sangat dekat dengan 1. Semakin mendekati 1 maka nilai koefisien determinasi semakin baik artinya hubungan tiap-tiap bilangan karbon terhadap $\ln(k')$ semakin linear. Nilai standar deviasi dari slope dan intersep juga sangat baik berturut-turut yaitu 0,04213 dan 0,40295 menunjukkan nilai yang kecil terhadap nilai slope dan intersepnya. Semakin kecil nilai deviasi dari slope dan intersep maka nilai slope dan intersep semakin presisi. Nilai ss residuals yang diperoleh sebesar 0,01775 menunjukkan nilai yang relatif kecil terhadap nilai ss regression artinya nilainya sangat baik. Semakin kecil nilai ss residuals maka pergeseran antara titik antara plot awal terhadap plot garis lurus semakin kecil. Dari semua nilai parameter regresi yang diperoleh terlihat hubungan linear antara bilangan karbon terhadap $\ln(k')$ deret homolog alkilparaben sangat baik.

Gambar 2 dan Tabel 6, dapat dilihat hubungan yang linear antara bilangan karbon terhadap

nilai Indeks Retensi (IR) alkilparaben. Hubungan linear tersebut ditunjukkan dari nilai-nilai parameter regresi yang dihasilkan dari hasil plot garis antara n_C terhadap nilai Indeks Retensi (IR) alkilparaben. Nilai koefisien determinasi (koefisien korelasi) yang diperoleh sebesar 0,992. Ini menunjukkan nilai yang sangat bagus karena nilai ini sangat dekat dengan 1. Semakin mendekati 1 maka nilai koefisien determinasi semakin baik artinya hubungan tiap-tiap bilangan karbon terhadap Indeks Retensi semakin linear. Nilai standar deviasi dari slope dan intersep juga sangat baik berturut-turut yaitu 5,95759 dan 0,09400 menunjukkan nilai yang kecil terhadap nilai slope dan intersepnya. Semakin kecil nilai deviasi dari slope dan intersep maka nilai slope dan intersep semakin presisi. Nilai ss residuals yang diperoleh sebesar 354,9283 menunjukkan nilai yang relatif kecil terhadap nilai ss regression artinya nilai yang sangat baik. Semakin kecil nilai ss residuals maka pergeseran antara titik antara plot awal terhadap plot garis lurus semakin kecil. Dari semua nilai parameter regresi yang diperoleh terlihat hubungan linear antara bilangan karbon terhadap Indeks Retensi deret homolog n-alkilparaben sangat baik. Gambar 3 dan Tabel 8, dapat dilihat hubungan yang linear antara nilai Indeks Retensi (IR) terhadap $\ln(k')$ dari alkilparaben.

Hubungan linear tersebut ditunjukkan dari nilai-nilai parameter regresi yang dihasilkan dari hasil plot garis antara Indeks Retensi (IR) terhadap $\ln(k')$ alkilparaben. Nilai koefisien determinasi (koefisien korelasi) yang diperoleh sebesar 0,99998. Semakin mendekati 1 maka nilai koefisien determinasi semakin baik artinya hubungan tiap-tiap $\ln(k')$ terhadap Indeks Retensi semakin linear. Nilai standar deviasi dari slope dan intersep juga sangat baik berturut-turut yaitu 0,00001 dan 0,00955 menunjukkan nilai yang kecil terhadap nilai slope dan intersepnya.

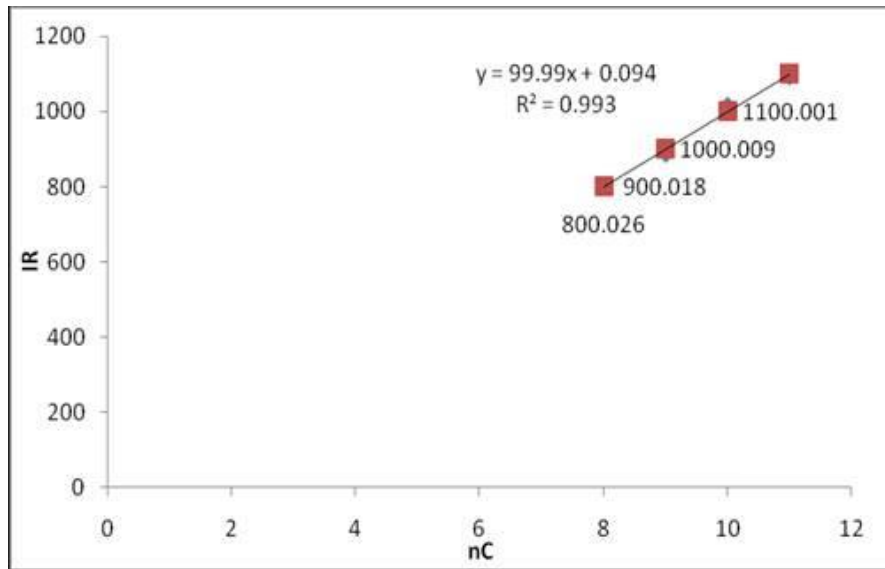
Semakin kecil nilai deviasi dari slope dan intersep maka nilai slope dan intersep semakin presisi. Nilai ss residuals yang diperoleh sebesar 1,00005 menunjukkan nilai yang relatif kecil terhadap nilai ss regression artinya nilainya sangat baik. Semakin kecil nilai ss residuals maka pergeseran antara titik antara plot awal terhadap plot garis lurus semakin kecil. Dari semua nilai parameter regresi yang diperoleh terlihat hubungan linear antara Indeks Retensi terhadap $\ln(k')$ deret homolog alkilparaben sangat baik.

Tabel 5. Data retensi hubungan n_C dengan Indeks Retensi(IR) deret homolog alkilparaben

n_C	IR	y(calc)	y-(b+mx)
8	802.133	800.026	2.10700
9	889.679	900.018	-10.33850
10	1014.37	1000.009	14.35600
11	1093.88	1100.001	-6.12450

Tabel 6. Parameter regresi plot antara n_C terhadap Indeks Retensi (IR) deret homolog alkilparaben

Parameter Regresi	Nilai	Parameter Regresi	Nilai
Slope	99.99150	Sdv regression	13.32157
Sdv slope	5.95759	F statistic	281.6992
Intercept	0.09400	Stat var	2
Sdv intersept	56.98766	Ss regression	49991.500
Coeff determn	0.99295	Ss residuals	354.9283



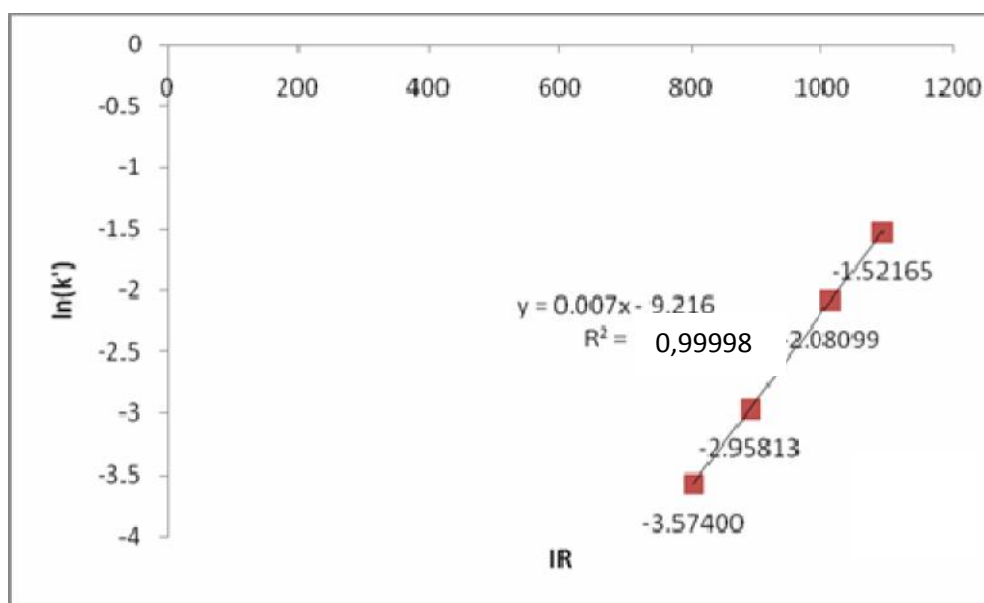
Gambar 2. Grafik hubungan linear antara n_C dengan Indeks Retensi(IR) deret homolog alkilparabenHubungan Linier Indeks Retensi (IR) Absolut dengan $\ln(k')$ Deret Homolog Alkilparaben

Tabel 7. Data retensi hubungan Indeks Retensi(IR) terhadap $\ln(k')$ deret homolog alkilparaben

IR	k'	$\ln(k')$	y(calc)	y-(b+mx)
802.133	0.028	-3.5756	-3.57400	-0.00155
889.679	0.052	-2.9565	-2.95813	0.00162
1014.37	0.125	-2.0794	-2.08099	0.00155
1093.88	0.218	-1.5233	-1.52165	-0.00161

Tabel 8. Parameter regresi plot antara Indeks Retensi (IR) terhadap $\ln(k')$ deret homolog alkilparaben

Parameter Regresi	Nilai	Parameter Regresi	Nilai
Slope	0.00703	Sdv regression	0.00224
Sdv slope	0.00001	F statistic	496717.91
Intercept	-9.21683	Stat var	2
Sdv intersept	0.00955	Ss regression	2.49155
Coeff determn	1.00000	Ss residuals	1.00005



Gambar 3 Grafik hubungan linear antara Indeks Retensi(IR) dengan $\ln(k')$ deret homolog alkilparaben

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dari penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan adalah deret homolog alkilparaben terbukti dapat digunakan untuk penentuan indeksretensi Kovats dalam RP-HPLC koefisien korelasi yang sangat baik pada sistempelarut MeHO/H₂O (90:10). Pada kolom C18 Waters Sunfire dapat terelusi semua dengan sangat baik pada sistem pelarut MeOH/H₂O (90:10) untuk deret homolog alkilparaben yang terelusi. Hal ini nilai indeks retensi yang diperoleh masih tergantung dengan komposisi pelarut.

REFERENSI

1. Berendsen, G.E., Schoenmaker, P.J., de Galan, L., Vigh, G., Varga-Puchony, Z., Inczedy, J. 1980. *On the Determination of the hold-up time in Reversed-Phase Liquid Chromatography*, J. of Liquid Chromatography, 3(11), 1669-1686.
2. Braithwaite, A. & Cooper, M., 1993, *A Rapid Spreadsheet Method for the Estimation of Dead Time*, Chromatographia 37: 1-2.
3. Didaoui, L., Touabet, A., Meklati, B.Y., Lewin-Kretzschmar, U., Engewald, W. 1993. *Comparison of retention indices of some explosives and related compounds calculated by different mathematical methods in reversed-phase liquid chromatography*, HRC-Journal of High Resolution Chromatography, 22:613 – 618.
4. Didaoui, L., Touabet, A., Ahmed, A.Y.B.H., Meklati, B.Y., Engewald, W. 1999. *Evaluation of Dead-time Calculation in Reversed-Phase Liquid Chromatography Using a Multiparametric Mathematical Method*, HRC-J. of High Resolution Chromatography, 22, 559.

5. Domínguez, J.A.G. & Díez-Masa, J.C., 2000, *The Hold-Up Volume Concept In Column Chromatography*, International Union Of Pure And Applied Chemistry.
6. Domínguez, J.A.G. & Díez-Masa, J.C., 2000, *Retention Parameters In Chromatography*, Pure Appl. Chem., 73:6, pp. 969–992.
7. Dong, M.W., 2006. *Modern HPLC for Practicing Scientists*, Synomics Pharmaceutical services, LLC, Wareham, Massachusetts.
8. Engelhardt, H., Muller, H., Dreyer, B., 1984, *Is There a "True" Dead Volume for HPLC Columns?*, Chromatographia Vol. 19.
9. Ettre, L.S. & Meyer, V.R. 2001. 1973 *When HPLC was Young, LC-GC Europe*, June
10. Garcia Dominguez, J.A., Garcia Munoz, J., Fernandez Sanchez, E., Molera, M.J. 1977. *Retention of Methane in Gas-Liquid Chromatography - New Evaluation Methods of the Mathematical Dead Time*, J. of Chromatographic Science 15, 520.
11. Garcia Dominguez, J.A., Garcia Munoz, J., Fernandez Sanchez, E., Molera, M.J. 1977. *Retention of Methane in Gas-Liquid Chromatography - New Evaluation Methods of the Mathematical Dead Time*, J. of Chromatographic Science 15, 520.
12. Gritti, F., Kazakevich, Y. Guiochon. G., 2007, *Measurement of hold-up volumes in reverse-phase liquid chromatography Definition and comparison between static and dynamic methods*, Journal of Chromatography A, 1161:157–169.
13. Guardino, X., Albaiges, J., Firpo, G., Rodrigues-Vinals, R., Gassiot, M. 1976. *Accuracy in the Determination of Kovats Retention Index*, Journal of Chromatography, 118:13
14. Idroes, R. 2002. *Verhalten der Retentionsdaten homologer Reihen als Bezugssystem und zur Vorhersage von Retentionsdaten in der RP-HPLC*, Tenea Verlag, Berlin
15. Idroes, R., 2010, *Alkylarylketone Homologous Series for Determination of Kovats Retention Indices with RP-HPLC using Acetonitrile/Water System*, Indonesian Journal of Chemistry, Vol. 10, No. 1, March.
16. Idroes, R., 2009, *Pemanfaatan Deret Homolog Alkilbenzena untuk Penentuan Nilai Indeks Retensi Kovats dalam RP-HPLC Sistem Pelarut Metanol/Air*, Majalah Farmasi Indonesia (*Indonesian Journal of Pharmacy*), Vol. 20, No. 2, 77-83.
17. Idroes, R., 2009, *Evaluasi Waktu Mati Kromatografi untuk Penentuan Indeks Retensi pada RP-HPLC Menggunakan Beberapa Deret Homolog*, Majalah Farmasi Indonesia (*Indonesian Journal of Pharmacy*), Vol. 20, No. 3, 133-140.
18. Idroes, R., 2005, *Determination of Absolute Retention Index System in High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)*, Malaysian Journal of Analytical Sciences, Vol. 9, No. 2, 224-232.
19. Idroes, R. & Oesman, F., 2011 *Penentuan Waktu Mati dan Pengaruhnya terhadap Indeks Retensi Kovats pada Sistem Kromatografi Gas dengan Kolom Kapiler Polar*, Indonesian Journal of Pharmacy Vol. 22 No.3.
20. Idroes, R., 2015, *Metode Perhitungan Indeks Retensi Kovats pada Sistem RP-HPLC Menggunakan Standar Deret Homolog yang mempunyai Gugus Kromofor*, Paten, P 00201501871.
21. Kovats, E., 1958, *Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen, Teil I: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone*, Helvetica Chemica Acta, Vol XLI, No. 206 (1058) 1915-1932
22. Lopez, J.E., & Dominguez, J.A. 1996. *The hold-up time in gas chromatography II. Validation of the estimation based on the concept of a zero carbon atoms alkane 1*, Journal of Chromatography A, 767 (1997) 127-136.
23. Malik, A., & Jinno, K., 1990, *Determination of Void/Dead Volume of Liquid Chromatographic Columns Containing [3-Cyclodextrin as the Stationary Phase*, Chromatographia, 30:3-4.
24. Marvin, C. McMaster., 2007. *HPLC A Practical User's Guide*, second edition, United States of America
25. Möckel, H.J., Dreyer, U., Melzer, H. 1992. *On the Determination of the Column Dead Waktu from Homologous Series*, Fresenius Journal Analytical Chemistry, 342, 673-677.
26. Nowotnik, D.P. & Narra, R. K. 1993. *A Comparison of methods for the determination of dead time in a reversed-phase high-performance liquid chromatography system used for the measurement of lipophilicity*, J. of Liquid Chromatography 16(18), 3919 – 3932.
27. Oumada, F.Z., & Roses, M. 2000. *Inorganic salts as hold-up time markers*

- in *C18*columns, *Talanta* 53 (2000) 667–677.
28. Sadek, P. C., 2004. *Illustrated Pocket Dictionary of Chromatography*, Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey
29. Torres, S.P *et.al.*, 2009. *Alternating Iterative Regression Method for Dead Time Estimation from Experimental Designs*, *Ana Bioanal Chem* 394, 625-636.
30. Torres, S.P *et.al.*, 2009. *Performance of Markers and the Homologous Series Method for Dead Time Estimation in Reversed-Phase Liquid Chromatography*, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32: 1065–1083.
31. Waetzig, H. 1992. *A straightforward algorithm to estimate the dead time in GC from the retention behavior of homologous series*, *Fresenius J Anal Chem* (1992) 344:354-356.