

LAPORAN PRAKTIKUM
ANALISA VITAMIN C METODE HPLC
HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY

Hari/Tanggal Praktikum : Kamis/ 30 Juni 2016

Nama Mahasiswa : 1. Irma Yanti

2. Rahmiwita

3. Yuliandriani Wannur Azah

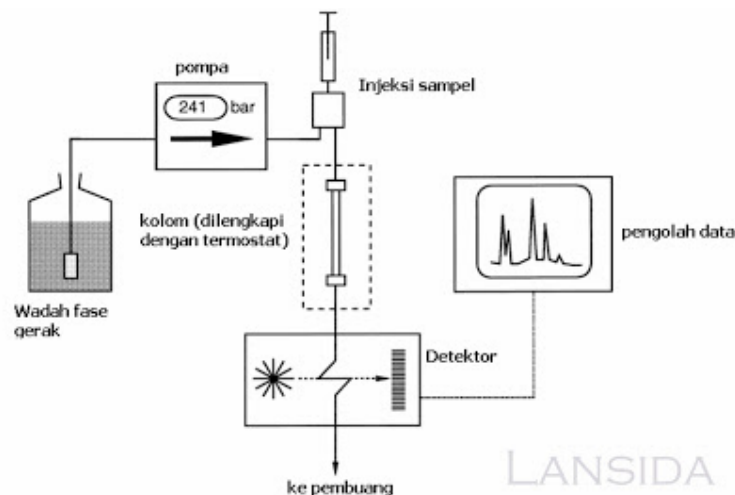
I. Tujuan Praktikum :

1. Mampu menentukan konsentrasi suatu berbagai vitamin C berdasarkan metode HPLC
2. Memahami prinsip kromatografi pada metode HPLC
3. Mampu membuat larutan standar dengan pengenceran dan perhitungan yang tepat
4. Mampu melakukan preparasi sampel vitamin C
5. Mampu melakukan analisa vitamin C dengan kurva kalibrasi

II. Teori

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) atau biasa juga disebut dengan Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Saat ini, HPLC merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis bahan obat, baik dalam bulk atau dalam sediaan farmasetik.

Instrumentasi HPLC pada dasarnya terdiri atas: wadah fase gerak, pompa, alat untuk memasukkan sampel (tempat injeksi), kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, dan suatu komputer atau integrator atau perekam. Diagram skematik sistem kromatografi cair seperti ini :



LANSIDA

HPLC merupakan teknologi analitik yang cakap dalam berbagai bidang dan secara luas digunakan untuk analisis obat-obatan, biomolekul, polimer-polimer dan banyak komponen organik maupun ionic.

Terdapat beberapa parameter kromatografi yang digunakan secara umum, yaitu :

1. Waktu tambat/waktu retensi.

Jarak antara puncak maksimal dari titik injeksi yang dinyatakan dalam unit waktu disebut waktu retensi. Waktu retensi berfungsi sebagai pengidentifikasi analit pada sistem partikuler.

Waktu retensi merupakan descriptor yang paling luas digunakan untuk analit, dan parameter yang paling mudah diukur dan merupakan parameter universal paling akhir.

Waktu retensi analit tergantung pada laju alir fase gerak dan stabilitas laju alir. Semakin cepat laju alir, semakin singkat waktu retensi.

2. Resolusi

Tujuan utama dalam HPLC adalah mendapatkan pemisahan campuran sampel yang baik. Untuk mendapatkannya diperlukan perhitungan ukuran kuantitatif dari pemisahan relative atau resolusi. Resolusi (R_s) dari dua puncak berdekatan didefinisikan sebagai perbandingan jarak antara dua puncak, dibagi dengan rata-rata lebar puncak.

3. Height equivalent of a theoretical plate (HETP)

$$\text{Rumus : } N = L/H$$

Dimana : H = Height equivalent of a theoretical plate (HETP)

N = jumlah total theoretical plate

L = panjang kolom

Nilai H menunjukkan ukuran efisiensi yang diberikan kolom tiap unit panjang kolom. Nilai H yang kecil menyatakan kolom yang lebih efisien dan nilai N yang besar. Agar nilai N maksimum dan efisiensi kolom paling tinggi, maka nilai H diminimalkan. Nilai H menurun dengan ukuran partikel kolom kecil, laju alir fase gerak rendah, fase gerak kurang kental, pemisahan pada temperature tinggi, molekul-molekul sampel kecil dan meningkatkan panjang kolom.

III. Alat dan Bahan

Labu Elenmeiyer 50ml, 100ml, dan 10ml	Aquadest
Mikropipet 100-1000 µl	Ascorbic acid untuk standart
Tabung reaksi	Tablet vitamin c sampel (IPI,Vitacimin,Vicee)
Timbangan digital	H ₂ O
Lumpang dan Alu	Methanol
Vial	H ₂ SO ₄

IV. Cara Kerja

a. Persiapan fase gerak dan alat HPLC

- Menyiapkan 500 mL larutan 55% (45% metanol dan ditambahkan 6 tetes 6 M H₂SO₄)
- Menghidupkan komputer dan alat HPLC dan mengatur program sesuai protokol HPLC dan analisa yang digunakan.

b. Persiapan Larutan Induk Vitamin C (asam askorbat).

- Pembuatan Larutan Baku Vitamin C 1000 ppm
Menyiapkan larutan baku vitamin C 1000 ppm sebanyak 50 mL menggunakan labu ukuran 50 mL. Jumlah vitamin C baku adalah sebanyak 50 mg dan ditambahkan aquadest sehingga 50 mL.

c. Pembuatan serial delution dari larutan induk vitamin V (asam askorbat).

- Siapkan 6 tabung reaksi dan diberi tanda standart 1- 6
- Tambahkan 2mL aquadest masing-masing pada tabung reaksi 2-6
- Pada tabung reaksi 1 tambahkan 4 ml larutan stok/induk
- Pada tabung reaksi 2 ditambahkan 2 ml dari tabung reaksi 1
- Pada tabung reaksi 3 ditambahkan 2 ml larutan dari tabung reaksi 2
- Pada tabung reaksi 4 ditambahkan 2 ml larutan dari tabung reaksi 3
- Pada tabung reaksi 5 ditambahkan 2 ml larutan dari tabung reaksi 4
- Pada tabung reaksi 6 ditambahkan 2 ml larutan dari tabung reaksi 5
- Masing-masing larutan disaring menggunakan Millipore dan ditampung dalam botol vial 2ml dan beri lebel dan di degasing selam 5 menit

Nomor Tabung	Pengenceran Asam Askorbat	Faktor	Konsentrasi (ppm)
1	Stok	-	1000
2	1 : 1	2	500
3	1 : 3	4	250
4	1 : 7	8	125
5	1 : 15	16	62,5
6	1 : 31	32	31,25

Tabel 1. Doubling Dilution Asam Askorbat 1000 ppm

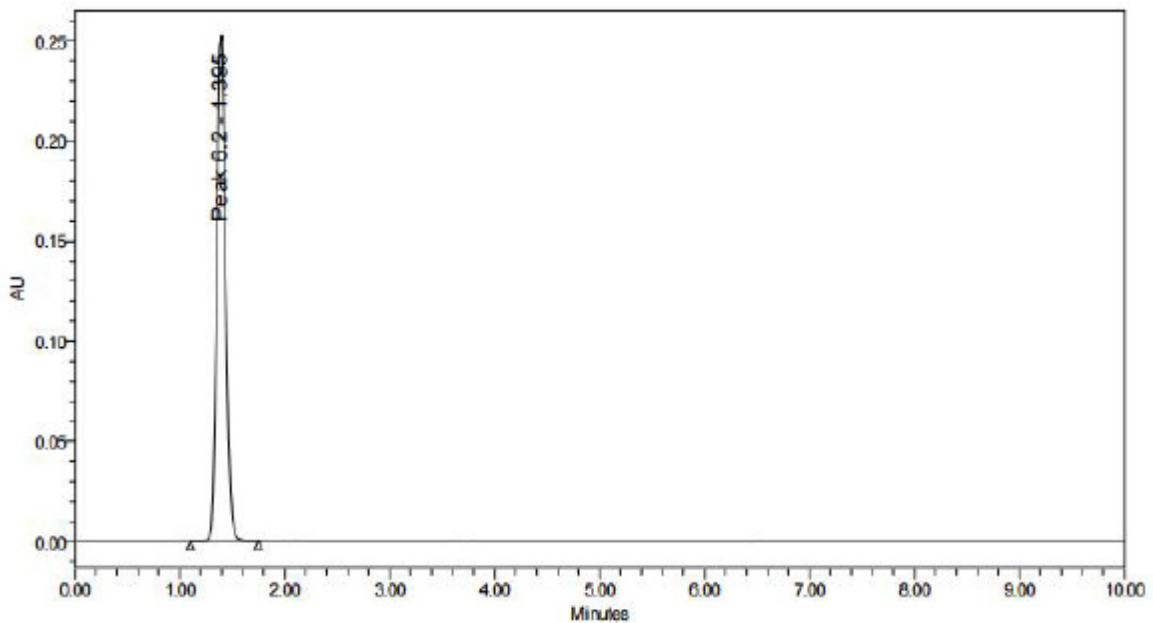
d. Persiapan sampel

- Sediakan tablet vitamin C berbeda, gerus masing-masing tablet sampai halus
- Larutkan 300 mg vitamin C dalam air dan encerkan sampai 100 mL air
- Mengambil alikuot 10 mL larutan diatas dan encerkan sampai 100 mL dengan air
- Larutan sampel disaring dengan Millipore dan ditampung dalam botol vial 2 mL, kemudian di degessing selama 5menit.
-

V. Hasil dan Pembahasan

Kromatogram tablet Vice

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Sample 1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Biomedik 2015
Vial:	7	Acq. Method Set:	Vitamin C_Mth_Set
Injection #:	1	Processing Method:	Std 6 biomedik 2015
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	10.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 254nm
Column Name:			
Date Acquired:	6/30/2016 1:41:30 PM WIT		
Date Processed:	7/1/2016 12:20:50 PM WIT		



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Units
1	Peak 6.1	0.996				
2	Peak 6.2	1.395	1490711	100.00	252753	ppm

Gambar Kromatogram hasil penyuntikan larutan vice dengan HPLC

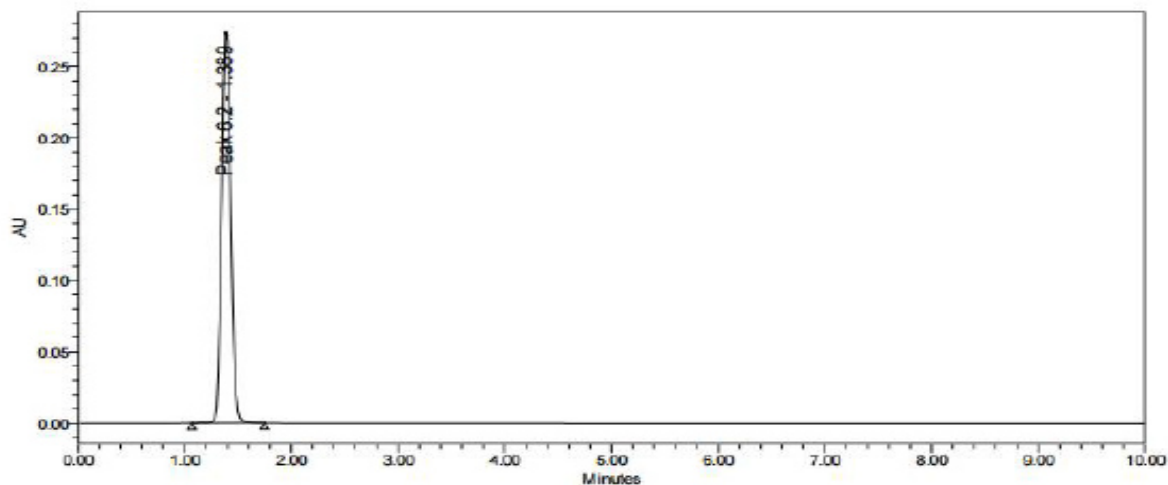
Dari kromatogram diatas dapat dilihat bahwa tablet vice memiliki *retention time* (RT, waktu retensi) 1,395 menit, dengan luas area 1490711.

RT merupakan jarak antara puncak maksimal dari titik injeksi yang dinyatakan dalam unit waktu. RT berfungsi sebagai pengidentifikasi analit pada sistem partikuler. Karena di kromatogram puncaknya ada satu, maka analit yang terdapat di tablet vice hanya 1 jenis yaitu vitamin C (100%), tanpa zat lain.

Luas area merupakan parameter yang lebih akurat untuk pengukuran kuantitatif. Untuk itu terlebih dahulu harus dibuat kurva kalibrasi standar parasetamol dan persamaan regresi linier $y = bx + a$, $y = \text{AUC}$ dan $x = \text{kadar sampel } (\mu/\text{ml})$. Masing-masing AUC yang didapat dicatat sebagai bahan penetapan kadar dengan cara mensubstitusikan nilai AUC ke dalam kurva kalibrasi vitamin C yang sudah diperoleh sebelumnya. Setelah itu ditentukan nilai perolehan kembali kadar vitamin C terhadap kadar pada kemasan sampel. Dengan ketiadaan informasi kromatogram untuk larutan standar, maka untuk selanjutnya kadar vitamin C dalam tablet Vice tidak dapat ditentukan.

2 Kromatogram tablet Vitacimin

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Sample 2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Biomedik 2015
Vial:	8	Acq. Method Set:	Vitamin C_Mth_Set
Injection #:	1	Processing Method:	Std 6 biomedik 2015
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	10.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 254nm
Column Name			
Date Acquired:	6/30/2016 1:52:09 PM WIT		
Date Processed:	7/1/2016 12:20:50 PM WIT		



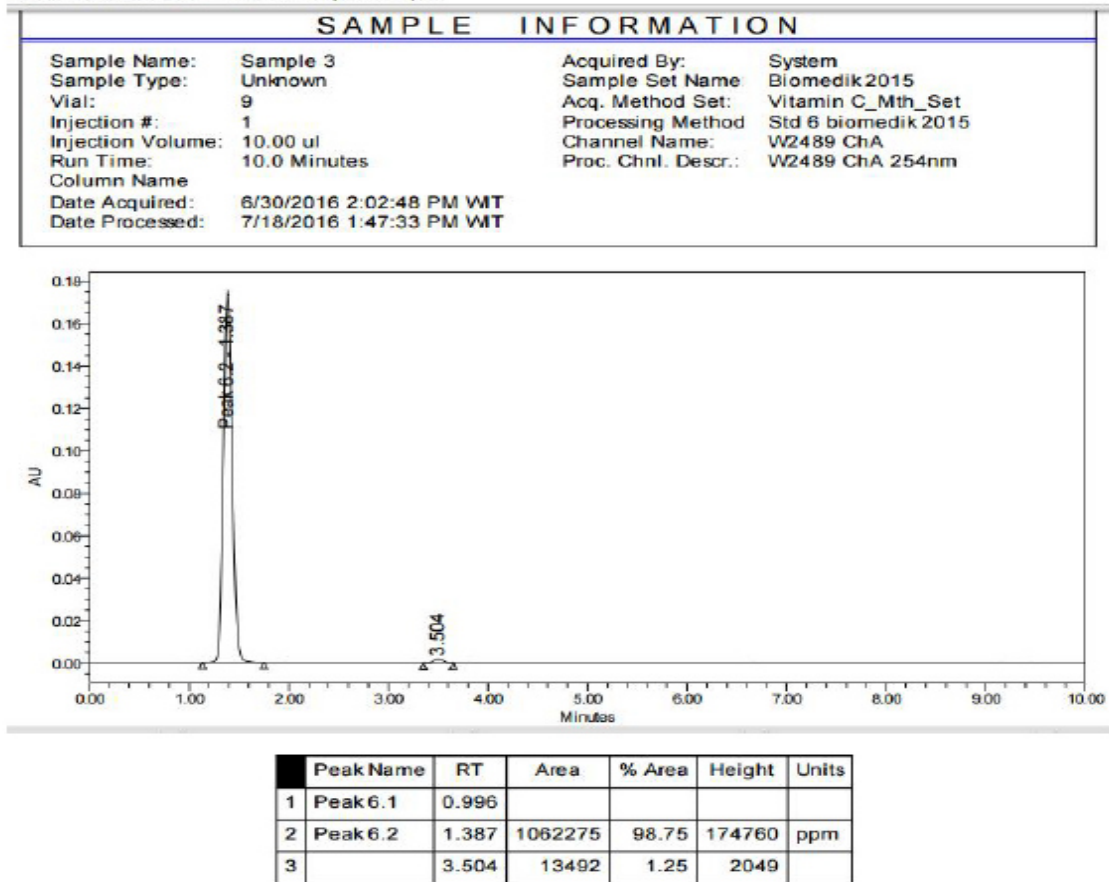
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Units
1	Peak 6.1	0.996				
2	Peak 6.2	1.389	1612603	100.00	275041	ppm

Gambar Kromatogram hasil penyuntikan larutan Vitacimin dengan HPLC

Dari kromatogram diatas dapat dilihat bahwa tablet vitacimin memiliki retention time (RT) 1,389 menit, dengan luas area 1126036. Analit yang terdapat pada Vitacimin hanya vitacimin

(100% vitamin C, tanpa zat aktif lain), hal ini digambarkan dengan puncak kromatogram yang berjumlah satu buah.

3. Kromatogram tablet IPI



Gambar Kromatogram hasil penyuntikan larutan IPI dengan HPLC

Dari kromatogram diatas dapat dilihat bahwa tablet IPI memiliki *retention time* (RT) 1,387 menit, dengan luas area 1062275. Terdapat dua puncak pada kromatogram, ini menandakan terdapat dua zat aktif di dalam tablet IPI. Vitamin C terdapat 98,75% sedangkan analit lain ada sekitar 1,25%.

Teknik HPLC merupakan satu teknik kromatografi cair-cair yang dapat digunakan baik untuk keperluan pemisahan, pengidentifikasian, maupun analisis kuantitatif yang didasarkan pada pengukuran luas puncak analit dalam kromatogram yang dibandingkan dengan luas area standar. Untuk mendapatkan data yang akurat, maka perbandingan dilakukan dengan

menggunakan teknik kurva kalibrasi. HPLC merupakan metode pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi tinggi yang dapat mengidentifikasi serta menetapkan secara kuantitatif bahan dalam jumlah yang sangat kecil.

VI. Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

1. HPLC adalah metode analisis berdasarkan prinsip kromatografi dengan teknik memisahkan campuran menjadi komponennya dengan perbedaan sifat fisik masing-masing komponennya.
2. HPLC pada praktikum kali ini seharusnya dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi vitamin C yang terdapat pada masing-masing sampel vitamin C dari pabrik-pabrik obat yang berbeda.
3. Konsentrasi berbagai sampel vitamin C tidak bisa diukur karena alat HPLC mengalami kesalahan teknis.

Saran

1. Penggunaan alat yang tepat seperti pada pengenceran larutan standar lebih baik dengan mikropipet dibandingkan dengan pipet mohr agar hasil yang didapat lebih akurat.
2. Sebaiknya sebelum praktikum dimulai para praktikan menyiapkan sampel vitamin C yang lebih bervariasi agar didapatkan variasi hasil konsentrasi sampel yang lebih banyak lagi.
3. Untuk praktikum selanjutnya agar alat untuk melakukan metode HPLC diperiksa kesiapannya terlebih dahulu agar tidak mengganggu kelancaran kegiatan praktikum.