

# **LAPORAN PRAKTIKUM**

## **HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)**

**NAMA : 1. KARIN TIKA FITRIA (NIM: 157008003)**  
**2. TM. REZA SYAHPUTRA (NIM: 157008007)**  
**3. SISKA MULYANI (NIM: 157008009)**

**HARI/TANGGAL PRAKTIKUM : KAMIS / 30 JUNI 2016**

**TEMPAT : LABORATORIUM TERPADU LANTAI 2**  
**UNIVERSITAS SUMATERA UTARA**

### **I. Tujuan Praktikum**

1. Praktikan memahami teknik HPLC.
2. Praktikan dapat menentukan kadar berbagai tablet Vitamin C menggunakan metoda HPLC.
3. Mampu membuat grafik dari pengenceran standar dan memperoleh rumus persamaan perhitungan konsentrasi sampel dengan regresi linier.

### **II. Teori**

Kromatografi pertama kali diperkenalkan oleh Tswett pada tahun 1903, ia menggunakannya untuk pemisahan senyawa-senyawa berwarna dan nama kromatografi diambil dari senyawa-senyawa yang berwarna. Senyawa berwarna yang digunakan Tswett sebagai sampel adalah pigmen-pigmen daun, karena warnanya maka cepat terlihat lokasinya dalam kolom. Saat ini kromatografi tidak lagi digunakan untuk pemisahan senyawa-senyawa berwarna saja. Senyawa-senyawa tidak berwarna dapat dilihat melalui fluoresensi dalam sinar ultraviolet. Pada dasarnya semua teknik kromatografi menggunakan dua fasa, yaitu fasa diam (*stationary*) dan fasa gerak (*mobile*); pemisahan-pemisahan tergantung pada gerakan relative dari dua fasa ini. Perlu diperhatikan bahwa fasa gerak yang digunakan tidak mempunyai efek terhadap fasa diam atau hanya sangat lemah diserap oleh fasa diam.

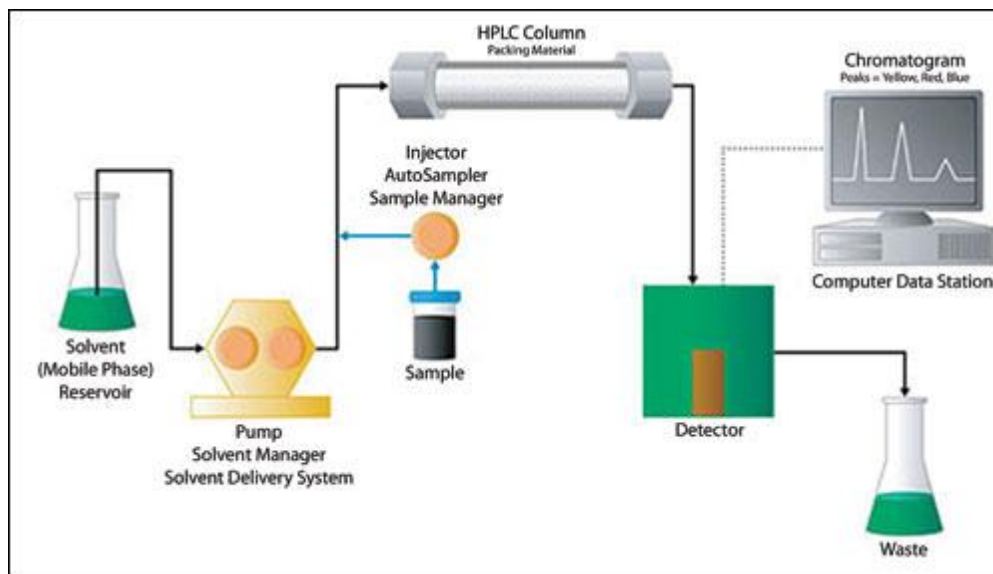
Salah satu jenis kromatografi yang sering digunakan adalah HPLC. HPLC atau *High Performance Liquid Chromatography* adalah sebuah instrumen yang menggunakan prinsip kromatografi (pemisahan) dengan menggunakan fase gerak cair yang dialirkan melalui

kolom yang merupakan fase diam menuju ke detektor dengan bantuan pompa. Sampel dimasukkan ke dalam aliran fase gerak dengan cara penyuntikan.

Di dalam kolom terjadi pemisahan senyawa-senyawa dalam kolom akan keluar atas dasar kepolaran yang berbeda, sehingga akan mempengaruhi kekuatan interaksi antara senyawa terhadap fase diam. Senyawa-senyawa yang kurang kuat interaksinya dengan fase diam akan keluar terlebih dahulu, dan sebaliknya senyawa yang berinteraksi kuat dengan fase diam akan keluar lebih lama.

Senyawa yang keluar dari kolom akan dideteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram. Dari kromatogram tersebut akan dapat diidentifikasi waktu retensi ( $t_R$ ) dan luas area/tinggi puncak. Informasi  $t_R$  digunakan untuk analisis kualitatif, sedangkan informasi luas area atau tinggi puncak untuk analisis kuantitatif.

HPLC terdiri dari fase gerak, pompa, injektor, kolom, detektor dan pengolah data.



**Gambar 1.** Skema instrumen HPLC

Fase gerak (eluen) berupa zat cair. Fase gerak selain sebagai pembawa senyawa campuran menuju detektor, fase gerak juga dapat berinteraksi dengan solut-solut. Beberapa persyaratan HPLC antara lain Harus bertindak sebagai pelarut yang baik untuk sampel yang akan dianalisis, Zat cair harus murni dan jernih untuk menghindari kotoran yang dapat mengganggu interpretasi kromatogram dan menghindarkan penyumbatan kolom, Mudah

diperoleh, murah, tidak mudah terbakar dan tidak beracun, Memiliki viskositas rendah, Sesuai dengan detektor yang digunakan.

Pompa di analogikan sebagai jantung, berfungsi mengalirkan fase gerak cair melalui kolom. Injektor merupakan tempat masuknya sampel. Sampel yang dimasukkan ke dalam HPLC hanya beberapa puluh microliter, adakalanya injektor merupakan suatu sistem autosampler.

Kolom HPLC berisi fase diam, tempat terjadinya pemisahan campuran menjadi komponen-komponennya. Biasanya berukuran antara 5-30 cm dan diameter dalam berkisar antara 4-10 mm.

Detektor dengan persyaratan untuk detektor antara lain harus cukup sensitif, stabilitas dan keterulangannya tinggi, respon terhadap sampel linier, waktu respon pendek sehingga tidak tergantung pada kecepatan alir, reliabilitas tinggi, mudah digunakan serta tidak merusak sampel.

Dalam industri farmasi, HPLC secara rutin digunakan untuk menganalisis produk obat. Pabrikan harus memastikan bahwa setiap produk memenuhi syarat yang ditentukan. Salah satunya adalah vitamin C. Berbagai jenis tablet vitamin C yang tersebar di pasaran, maka untuk mengetahui kuantitas kadar asam askorbat yang dikandung oleh vitamin C tersebut maka dipilih beberapa tablet C Vitamin (asam askorbat) untuk memastikan konsentrasi tablet Vitamin C tersebut sesuai label.

### III. Alat dan Bahan

Alat	Bahan
Labu Erlenmeiyer 50ml, 100ml dan 10ml	Aquadest
Mikropipet 100-1000 µl dan tip	Ascorbic acid untuk standard
Tabung reaksi	Tablet vitamin C sampel (IPI, Vitacimin, Vicee)
Timbangan digital	H <sub>2</sub> O
Lumpang dan Alu	Methanol
Vial	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

Waters® Alliance 2695 HPLC  
Separations Module Column  
Compartment &  
Waters® 2489 UV/Visible Detector

#### IV. Cara Kerja

##### a. Persiapan fase gerak dan alat HPLC

- Menyiapkan 500 mL larutan 55% air yang terdiri dari 45% metanol dan ditambahkan 6 tetes 6 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Menghidupkan komputer dan alat HPLC, mengatur program sesuai dengan protokol alat HPLC tersebut dan sesuai dengan kondisi 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 ukur 50 ml. Jumlah Vitamin C baku yang harus ditimbang adalah sebanyak 50 mg dan ditambahkan aquadest hingga 50 ml

Tips dalam membuat larutan dengan akurat :

- Setelah menimbang bahan asam askorbat dalam timbangan digital, kemudian memasukkan bahan ke dalam labu Erlenmeyer, bilas alas kertas/plastik wadah yang digunakan untuk menimbang dengan aquadest agar seluruh bahan masuk ke dalam labu Erlenmeyer.
- Memasukkan aquadest dengan cara melewatkan ke sisi dinding labu Erlenmeyer untuk membilas sisa bahan yang menempel di dinding labu erlenmeyer
- Sebelum menambahkan aquadest hingga volume yang dibutuhkan, dinding sisi bagian dalam labu dikeringkan, kemudian baru menambahkan aquadest hingga mencapai batas volume. Hal ini dilakukan agar jumlah aquadest yang dimasukkan akurat, sebab tetesan aquadest yang masih menempel di dinding walaupun sangat kecil dapat mempengaruhi konsentrasinya
- Menutup labu dan membolak balikkan labu agar bahan tercampur dan terlarut dengan merata.

**c. Pembuatan serial dilution (double dilution) dari Larutan Induk Vitamin C (asam askorbat)**

- Menyediakan 6 tabung reaksi, diberi tanda standart 1 s/d 6.
- Menambahkan 2 ml akudes masing-masing pada tabung reaksi 2 s/d 6.
- Pada tabung reaksi 1 tambah 4 ml larutan stok/induk.
- Pada tabung reaksi 2 tambah 2 ml larutan yang diambil dari tabung reaksi 1. Campur dengan baik.
- Pada tabung reaksi 3 tambah 2 ml larutan yang diambil dari tabung reaksi 2. Campur dengan baik
- Pada tabung reaksi 4 tambah 2 ml larutan yang diambil dari tabung reaksi 3. Campur dengan baik
- Pada tabung reaksi 5 tambah 2 ml larutan yang diambil dari tabung reaksi 4. Campur dengan baik
- Pada tabung reaksi 6 tambah 2 ml larutan yang diambil dari tabung reaksi 5. Campur dengan baik
- Masing masing larutan disaring menggunakan Millipore dan ditampung dalam botol vial 2 ml, beri labelkemudian di degassing selama + 5 menit.

**Tabel 1. Doubling Serial Dilution Stok Asam Askorbat 1000 ppm**

<b>Nomor Tabung</b>	<b>Pengenceran Asam Askorbat</b>	<b>Faktor</b>	<b>Konsentrasi (ppm)</b>
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



**Gambar 2. a.** Persapan fase gerak (500 mL larutan 55% air yang terdiri dari 45% metanol dan ditambahkan 6 tetes 6 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ditempatkan pada botol dan disambungkan pada selang yang terhubung pada alat HPLC) serta alat HPLC (Waters® Alliance 2695 HPLC Separations Module Column Compartment & Waters® 2489 UV/Visible Detector); **b.** Timbangan digital (*Digital Scale and Balance*). **c.** Micropipette berukuran 100-1000 µl **d.** Asam askorbat, larutan induk asam askorbat 1000 ppm dalam labu erlenmeyer serta serial/double dilution faktor 2,4,8, 16 dan 32



**Gambar 3.** a. 3 sampel vitamin C digerus halus b. tiap sampel ditimbang sebanyak 300 mg dan dibuat larutan hingga 100 ml, 10 ml aliquot larutan tersebut diambil dan diencerkan kembali dengan menambahkan air hingga 100 ml (berhubung labu erlenmeyer yang tersedia untuk pengenceran kedua berukuran 10 ml, maka aliquot yang diambil sebanyak 1 ml, dan untuk labu berukuran 25 ml maka aliquot yang diambil sebanyak 2,5 ml) c. vial, saringan milipore dan spuit d. Menyaring sampel dan standar serta memasukkan ke dalam vial e. Standard 1-6 di dalam vial f. Sampel 1, 2 dan 3 dalam konsentrasi 300 mg/10.000ml g. *Branson 5200 Ultrasonic Cleaner* untuk melakukan degassing vial

#### d. Persiapan sampel

- Menyediakan beberapa tablet vitamin C berbeda, menggerus halus masing-masing tablet tersebut
- Melarutkan 300 mg vitamin C dalam air dan diencerkan sampai 100,0 mL air.
- Mengambil alikuot 10 mL larutan di atas dan diencerkan sampai 100,0 mL dengan air
- Larutan sampel disaring dengan Millipore dan ditampung dalam botol vial 2 ml, kemudian di degassing selama + 5 menit.

#### e. Menjalankan alat HPLC

- Vial yang berisi standard 1-6 dan sampel 1,2 dan 3 dimasukkan ke dalam alat HPLC
- Menghidupkan Komputer, Alat HPLC (*Waters® Alliance 2695 HPLC Separations Module Column Compartment & Waters® 2489 UV/Visible Detector*);
- Mengatur program untuk menjalankan alat HPLC dengan panjang gelombang yang telah ditentukan (254 nm)

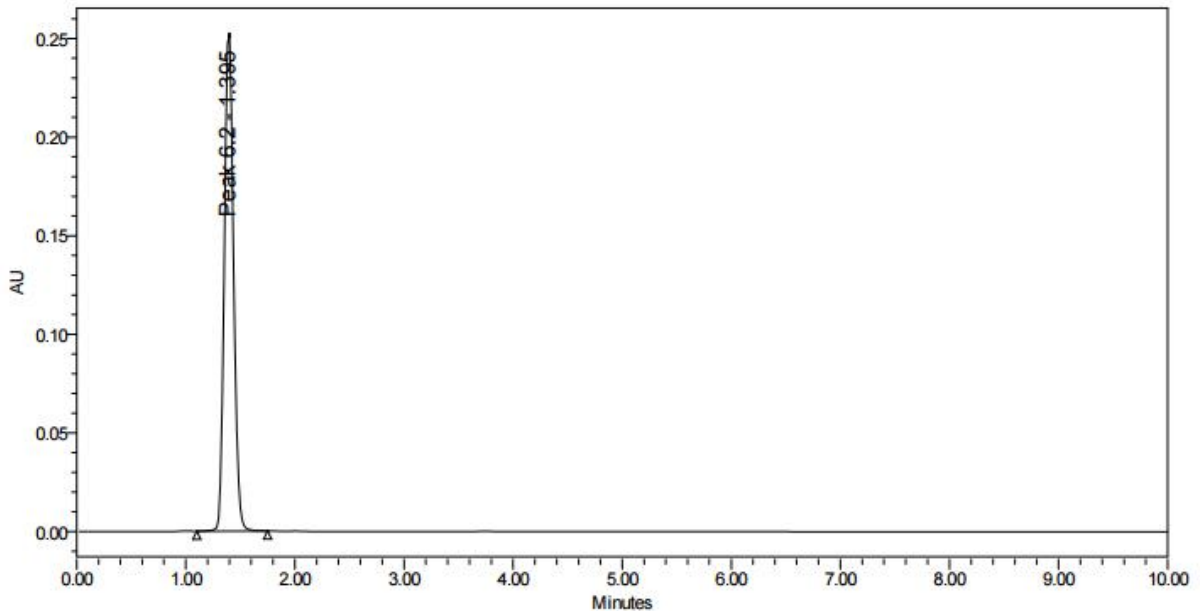


**Gambar 4.** a. Memasukkan vial ke dalam alat HPLC b. display layar alat HPLC *Waters® Alliance 2695 HPLC Separations Module Column Compartment* c. display layar *Waters® 2489 UV/Visible Detector*

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan HPLC dari sampel tablet vitamin C dilakukan secara otomatis oleh program komputer dengan membandingkan nilai absorbansi dengan absorbansi yang diperoleh dari kalibrasi standard. Standard yang dimasukkan untuk mengkalibrasi pemeriksaan kadar vitamin C menggunakan HPLC ini sebanyak 6 vial standar dengan konsentrasi 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dan 31,25 ppm.

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 5.** Diagram kromatogram sampel 1

Dari gambar 5 tampak kromatogram atau hasil kromatografi dari sampel 1. Pada grafik tersebut, sumbu x mewakili waktu retensi/RT (menit). RT adalah waktu dimana injeksi sampel memasuki kolom hingga terdeteksi oleh detektor. Retention Time lebih panjang jika analit memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap fase diam dikarenakan struktur kimianya. Informasi RT digunakan untuk analisis kualitatif, atau untuk mengidentifikasi suatu analit tertentu dengan membandingkannya dengan standar analit murni. Sedangkan sumbu y mewakili nilai unit absorbansi (*Absorbance Unit*). Untuk melakukan analisa secara kuantitatif maka yang digunakan adalah luas area atau tinggi puncak dari grafik tersebut. Dari grafik dapat diketahui bahwa vitamin C pada sampel 1 memiliki Retention Time (RT) yaitu 1,395 menit, luas area 1.490.711 unit luas area, sementara ketinggian puncak grafik / peak berada pada 0,252753 AU atau 252.753  $\mu$ AU. % Area pada sampel adalah 100%.

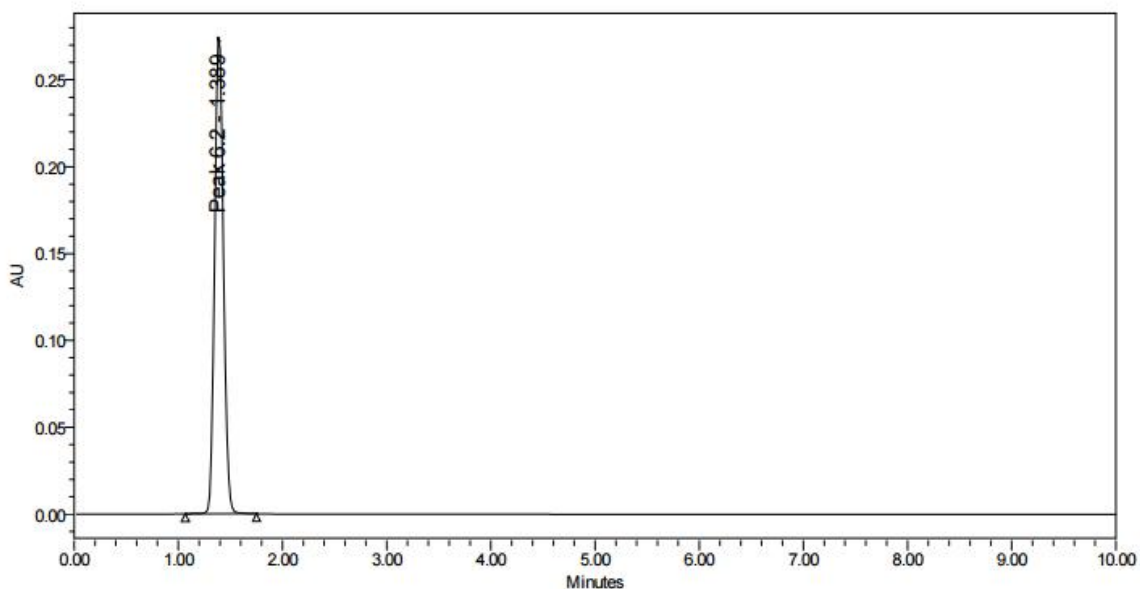
Penggunaan larutan asam askorbat murni 1000 ppm dengan beberapa tingkatan dilusi digunakan sebagai standar kalibrasi. Jika larutan sampel memiliki beberapa jenis analit, maka kromatogram yang diperoleh akan memunculkan beberapa puncak grafik atau peak dengan waktu retensi(RT) yang berbeda beda. Oleh karena itu dengan melakukan kromatografi pada larutan standard maka akan diketahui letak *Retention Time(RT)*/ Waktu retensi asam askorbat murni. Kemudian, dari kromatografi yang dijalankan pada keenam jenis standard tersebut maka dapat diperoleh kurva kalibrasi dan persamaan untuk menghitung konsentrasi asam askorbat sampel.

Sementara % area pada sampel 1 sebesar 100% yang berarti bahwa sampel 1 memiliki kemurnian 100%. Hal ini dapat dilihat bahwa % area merupakan proporsi dari luas area di bawah peak yang dimaksud dibandingkan seluruh peak yang terbentuk. Pada sampel 1 hanya terdapat 1 peak, dan peak yang terdeteksi berada pada RT yang sama dengan RT asam askorbat pada standart. Sehingga dapat dikatakan bahwa pada sampel 1 terdapat kandungan asam askorbat murni 100%.

Larutan vitamin c yang dibuat pada sampel 1 adalah sebesar 300 g/1000 ml atau 300 g/l atau 300.000 ppm. Untuk menghitung konsentrasi sampel berdasarkan pemeriksaan HPLC, maka dibutuhkan informasi mengenai luas area peak pada tiap tiap konsentrasi standard. Kemudian setelah dibuat kurva linier hubungan Antara konsentrasi dengan luas area absorbansi maka dapat ditentukan persamaan untuk mencari konsentrasi pada luas area

tertentu. Ketinggian peak juga dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi, namun, luas area lebih baik digunakan karena nilainya lebih stabil dibandingkan dengan ketinggian peak. Pada praktikum ini dapat diasumsikan karena kemurnian dari sampel adalah 100% maka konsentrasi larutan sampel 1 yang dibuat adalah murni 100% asam askorbat.

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 biomedik2015
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		

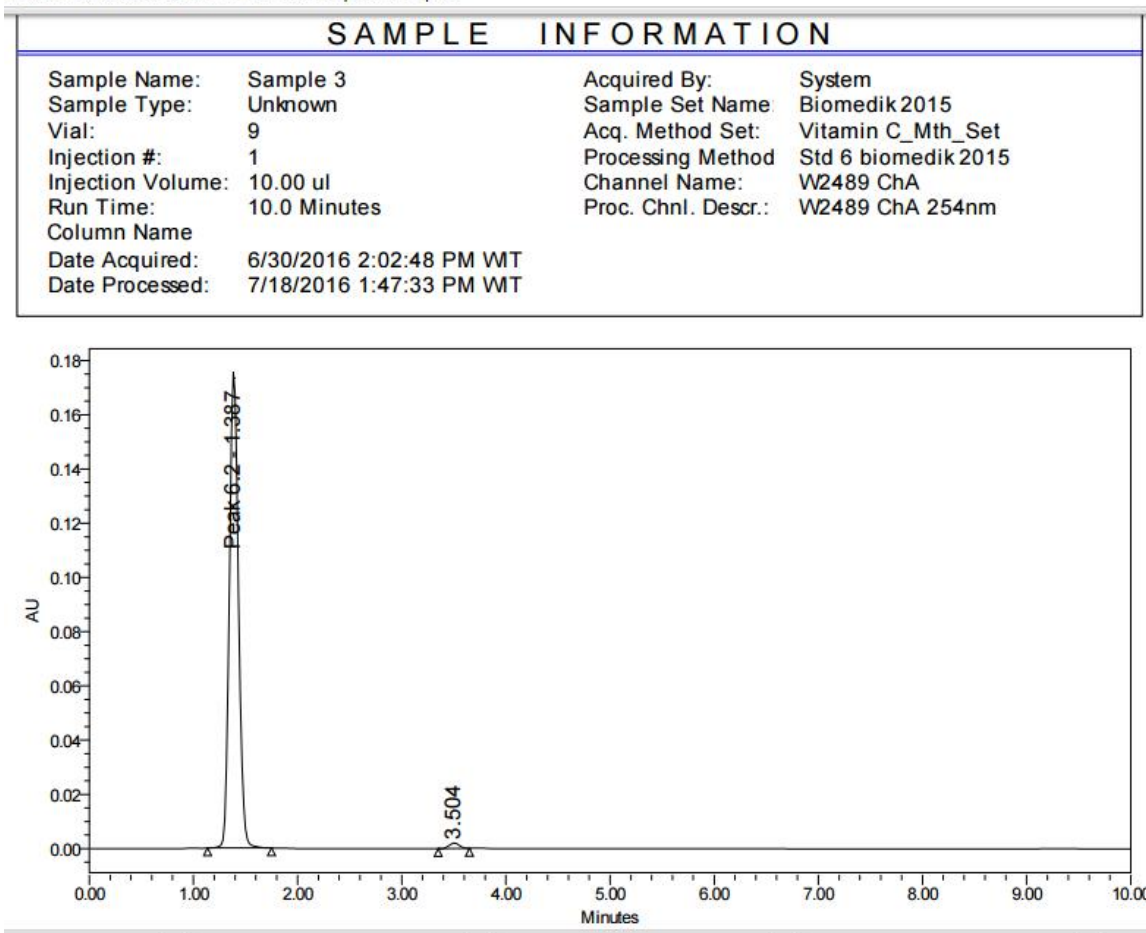


	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Units
1	Peak 6.1	0.996				
2	Peak 6.2	1.389	1612603	100.00	275041	ppm

**Gambar 6.** Diagram kromatogram sampel 2

Dari grafik dapat diketahui bahwa vitamin C pada sampel 2 memiliki Retention Time (RT) yaitu 1,389 menit, luas area 1.612.603 unit luas area, sementara ketinggian puncak grafik / peak berada pada 0,275041 AU atau 275.041  $\mu$ AU. % Area pada sampel adalah 100%. Larutan vitamin c yang dibuat pada sampel 2 adalah sebesar 300 g/1000 ml atau 300

g/l atau 300.000 ppm Sementara kemurnian sampel adalah 100%. Jadi pada sampel yang kedua kadar asam askorbat juga murni 100%



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Units
1	Peak 6.1	0.996				
2	Peak 6.2	1.387	1062275	98.75	174760	ppm
3		3.504	13492	1.25	2049	

**Gambar 7.** Diagram kromatogram sampel 3

Dari gambar 7 dapat diketahui bahwa vitamin C pada sampel 3 memiliki 2 jenis peak, Retention Time (RT) peak pertama yaitu 1,387 menit, yang mirip dengan asam askorbat seerti pada standard dan larutan sampel 1 dan 2, serta ditemukan peak yang kedua yaitu pada menit ke 3,504. Ini membuktikan ada analit lain yang ditemukan pada sampel ini selain asam askorbat. luas area untuk peak yang diduga asam askorbat adalah 1.062.275 unit luas area, sementara ketinggian puncak grafik / peak berada pada 0,174760 AU atau 174.760

$\mu$ AU. % Area pada sampel adalah 198.75 %. Larutan vitamin c yang dibuat pada sampel 3 adalah sebesar 300 g/1000 ml atau 300 g/l atau 300.000 ppm Namun kemurnian sampel adalah 98,75 %. Artinya pada sampel yang ke tiga, kandungan tidak murni asam askorbat namun ada analit lain sebesar 1,25%.

Vitamin C (asam askorbat, askorbat, AA) adalah senyawa organik yang larut dalam air yang terlibat dalam banyak proses biologis. Vitamin C telah banyak digunakan dalam sediaan farmasi dan kosmetik untuk melindungi tubuh terhadap oksidasi. Namun sediaan farmasi biasanya mengandung berbagai eksipien yang mungkin muncul, serta kemungkinan adanya degradasi produk atau menstabilkan agen antioksidan untuk vitamin C. Metode HPLC memiliki keuntungan karena dianggap sensitif dan merupakan metode selektif sehingga cocok untuk penentuan zat aktif dalam suatu sediaan farmasi seperti vitamin C.

Dalam pemeriksaan kemurnian menggunakan HPLC beberapa vitamin C yang tersedia di pasar yaitu sampel 1 (tablet hisap VICE), sampel 2 (Tablet hisap Vitacimin) dan sampel 3 (Tablet vitamin C IPI), maka dapat diperoleh hasil bahwa sampel 1 dan 2 murni asam askorbat 100% sementara sampel 3 98,75%.

## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### KESIMPULAN

Dari praktikum ini dapat disimpulkan

1. HPLC atau *High Performance Liquid Chromatography* adalah suatu jenis pemeriksaan untuk mengidentifikasi secara kualitatif dan kuantitatif suatu molekul dengan cara memisahkan analit berdasarkan kepolarannya dan kemudian dideteksi dengan menggunakan prinsip kromatografi (pemisahan) yaitu dengan menggunakan fase gerak cair yang dialirkan melalui kolom yang merupakan fase diam menuju ke detektor dengan bantuan pompa.
2. Untuk mengidentifikasi suatu analit yang ingin diperiksa keberadaannya ataupun jumlahnya dalam sampel, maka diperlukan beberapa standar dengan berbagai konsentrasi untuk menentukan RT dari suatu analit tertentu. RT atau Retention Time adalah waktu ketika injeksi sampel memasuki kolom hingga terdeteksi.
3. Hasil kromatografi HPLC disebut kromatogram. sumbu X mewakili waktu retensi atau Retention Time (RT) sedangkan sumbu Y untuk absorbansi unit. Dari kromatogram akan terlihat grafik parabola dengan satu atau beberapa puncak atau peak yang menunjukkan adanya suatu analit yang terdeteksi. Untuk menghitung konsentrasi dapat digunakan luas area di bawah puncak peak atau ketinggian peak. Namun para ahli menyarankan untuk lebih menggunakan luas area karena nilainya lebih stabil. Dengan membandingkan luas area absorbansi tiap standart terhadap konsentrasinya, maka dapat ditentukan korelasi dan persamaannya sehingga dapat dihitung konsentrasi analit yang sama dalam suatu larutan dengan memasukkan dalam persamaan tersebut.
4. Informasi lain dalam kromatogram yaitu % area yang berfungsi untuk meliha kemurnian dari sampel. Terkadang bila sampel tidak murni maka akan muncul beberapa puncak, persentasi luas area di bawah puncak dari analit yang diperiksa dibandingkan jumlah luas area semua puncak yang terbentuk, menentukan proporsi dari analit tersebut dalam larutan. Larutan murni memiliki % area 100%
5. Dalam praktikum ini digunakan larutan standard dari asam askorbat 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm serta 31,25 ppm.

6. Pemeriksaan HPLC dilakukan terhadap 3 jenis vitamin C yang terjual di pasaran yaitu sampel 1 (tablet hisap VICE), sampel 2 (Tablet hisap Vitacimin) dan sampel 3 (Tablet vitamin C IPI). Diperoleh hasil bahwa sampel 1 dan 2 murni asam askorbat 100% sementara sampel 3 kemurniannya sebesar 98,75%.

## SARAN

1. Penting untuk teliti dalam persiapan alat dan bahan, penggerusan, menimbang, mengencerkan, penggunaan semua alat seperti labu erlenmeyer, mikropipet, vial, memasukkan sampel ke dalam vial melalui micropore dan lainnya untuk mendapatkan larutan standar yang tepat serta hasil pengukuran sampel yang benar.
2. Penting untuk dipelajari lebih dahulu selain tahapan kerja, penggunaan alat dan bahan namun juga hasil yang nantinya diharapkan sehingga praktikum dapat berjalan efektif dan efisien

## Referensi

1. <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500142102rb1.pdf>
2. [http://www.vtpup.cz/common/manual/Extern\\_QUINTA-ANALYTICA\\_Waters\\_2695D\\_manual1\\_EN.pdf](http://www.vtpup.cz/common/manual/Extern_QUINTA-ANALYTICA_Waters_2695D_manual1_EN.pdf)
3. <https://arycho.files.wordpress.com/2012/04/skema-hplc1.jpg>
4. Mitić SS, Kostić DA, Nasković- Đokić DC & Mitic MN. 2011. Rapid and Reliable HPLC Method for the Determination of Vitamin C in Pharmaceutical Samples. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 10(1): 105-111