

LAPORAN PRAKTIKUM

ISOLASI DNA, Isolasi Protein dan PCR (Elektroforesis agarose dan Acrylamic)

Nama : Rebecca Rumesty Lamtiar (127008016)
Yulia Fitri Ghazali (127008007)
Paska Rahmawati Situmorang (127008011)

Hari / Tanggal Praktikum : Rabu / 19 Desember 2012

Waktu Praktikum : Pukul 12.00 – 17.30 WIB

Latar belakang:

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 di gunakan 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 floresensi 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. Dalam industri farmasi, HPLC secara rutin digunakan untuk menganalisis produk obat. Pabrikan harus memastikan bahwa setiap produk memenuhi syarat yang ditentukan. Sebagai analis QC, Anda akan menganalisis beberapa tablet C Vitamin (asam askorbat) untuk memastikan konsentrasi tablet Vitamin C tersebut sesuai label dan memiliki jumlah yang konsisten dari vitamin C dalam setiap tablet.

Tujuan Praktikum: Menentukan kadar berbagai tablet Vitamin C menggunakan metoda HPLC

Alat dan Bahan

1. Instrumen

Alat *High Performance Liquid Chromatograph* (HPLC) yang digunakan yaitu **Alliance 2695**, Detector **UV/VIS 2489** dilengkapi dengan kolom C-18, diameter 5 ul, ukuran 4,6 x 150 mm dan Detektor UV-Vis yang terhubung.

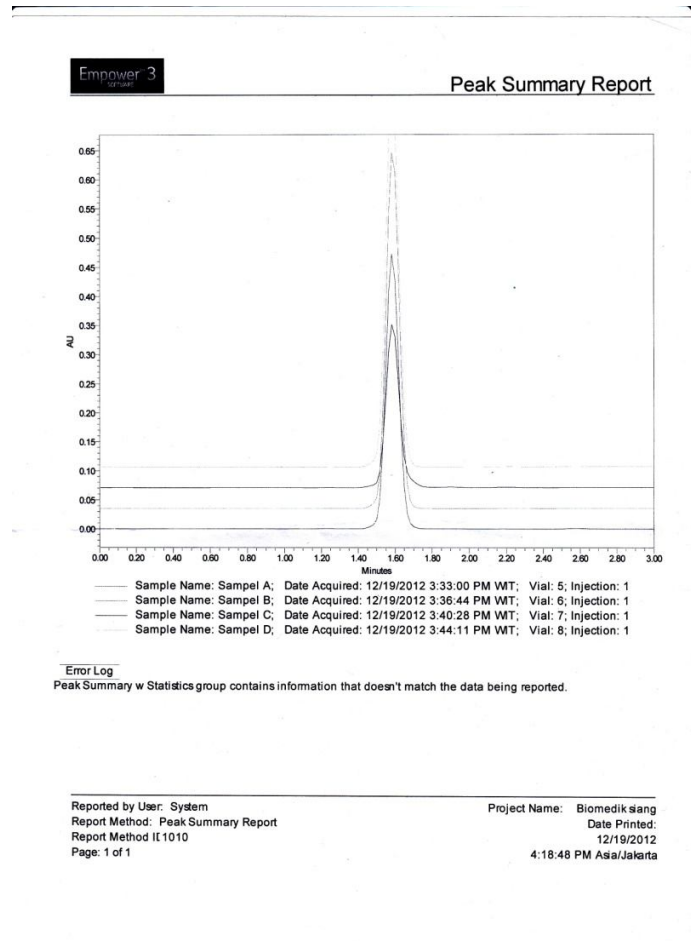
2. 500 mL larutan yang terdiri dari 55% air: metanol 45%
3. 6 tetes 6 M H₂SO₄
4. 0,05 mg / mL Vitamin C

Cara Kerja:

1. **Persiapan Standar Vitamin C (asam askorbat) Satu kelompok menyiapkan satu sampel**
 - a. Siapkan 0,20 mg / mL (200 ppm) Vitamin C standar diencerkan dengan air.
 - b. Siapkan 0,15 mg / mL (150 ppm) Vitamin C standar diencerkan dengan air
 - c. Siapkan 0,10 mg / mL (10 ppm) Vitamin C standar diencerkan dengan air.
 - d. Siapkan 0,05 mg / mL (50 ppm) Vitamin C standar diencerkan dengan air.
2. **Persiapan sampel**
 - a. Sediakan beberapa tablet vitamin C berbeda, gerus halus masing-masing tablet tersebut (tablet vitacimin dan tablet xon ce)
 - b. Larutkan 300 mg (massa terdekat 0,1 mg) dalam air dan encerkan sampai 100,0 mL air dalam labu ukur 100 ml (**JANGAN memanaskan solusi**).
 - c. Ambil alikuot 10,00 mL larutan dan encerkan sampai 100,0 mL dengan air
 - d. Setelah diencerkan, ambil 10 ml larutan dan masukkan ke dalam labu ukur 10 ml yang kering dan bersih.
 - e. Ulangi untuk sampel vitamin C lainnya (tiap kelompok mengerjakan satu sampel)
3. **Persiapan fase gerak dan alat HPLC**
 - a. Siapkan 500 mL larutan 55% air: metanol 45% dan tambahkan 6 tetes 6 M H₂SO₄.
 - b. Hidupkan komputer dan alat HPLC, set sesuai dengan protokol alat HPLC tersebut dan sesuai dengan kondisi analisa yang digunakan.
4. **Persiapan panjang gelombang Max Vitamin C**
 - a. Siapkan 0,05 mg / mL Vitamin C standar dan tentukan panjang gelombang absorbansi maksimum untuk Vitamin C menggunakan spektrofotometer UV / Vis dengan $\lambda = 200-400$ nm.
 - b. Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk detector HPLC yang digunakan.
5. **Analisis Vitamin C**
 - a. Siapkan kurva kalibrasi dan tentukan konsentrasi vitamin C setiap sampel
 - b. Hitung standar deviasi relatif dan rata-rata untuk lima hasil sampel.
 - c. Sampel tablet harus memiliki nilai rata-rata (Assay) dalam 10% dari klaim label dan standar deviasi relatif (Keseragaman Content) harus kurang dari 5% untuk tablet yang akan diteruskan kepada konsumen. Apakah tablet lulus?

Hasil Praktikum dan Pembahasan

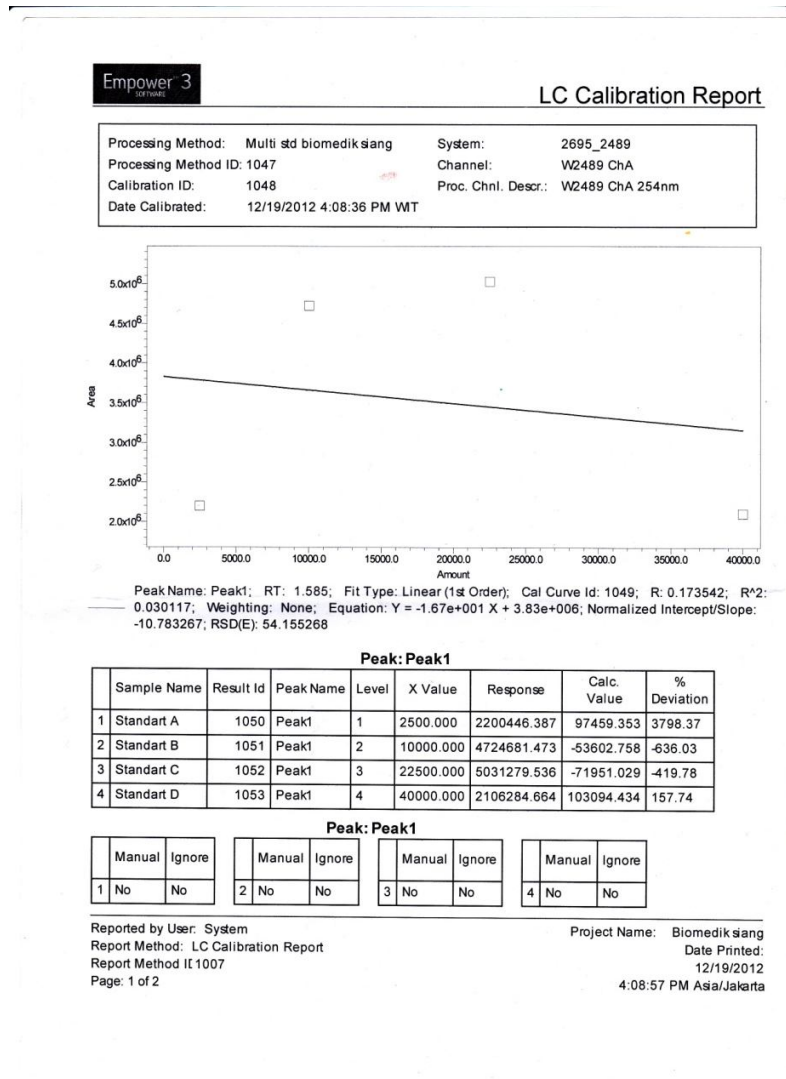
1. Gambar kurva hasil pengukuran kadar vitamin C dengan metode HPLC



Gambar1. Ekspresi Puncak Gelombang Vitamin C

Pada gambar ini terlihat memang vitamin C muncul dalam gambar laporan puncak. Puncak Gelombang vitamin C muncul pada menit ke 1,6. Ini sesuai dengan standart vitamin C yang digunakan. Artinya bahwa benar sampel mengandung vitamin C.

2. Hasil pengukuran Kadar sampel



Gambar 2. Grafik Pengukuran Kadar Vitamin C yang Terkandung dalam Sampel.

Kadar vitamin C yang terkandung dalam sampel tidak dapat diukur berdasarkan persamaan linear yang didapat dari metode HPLC ini. Seharusnya semakin tinggi konsentrasi vitamin c maka semakin luas juga area tampilan gelombang vitamin C. Tapi hal ini tidak terlihat pada hasil praktikum. Ini terjadi dikarenakan adanya kesalahan dalam pembuatan sampel dalam proses

pengenceran. Proses pengenceran larutan sampel harus dilakukan dengan teliti dan hati-hati. Wadah yang dipakai harus benar-benar bersih dan kering, lalu pada akhir penambahan cairan harus dilakukan dengan tepat dan teliti sehingga sehingga kadar yang diinginkan benar-benar tergambar.

Kesimpulan :

1. Metode HPLC adalah salah satu metode yang dapat dipakai untuk melihat konsentrasi/kandungan dari sampel yang ingin kita amati.
2. Prosedur dalam pembuatan larutan yang ingin kita amati haruslah benar, tepat dan perlu ketelitian yang tinggi.
3. Hasil pengukuran konsentrasi vitamin C tidak didapatkan.

Saran :

1. Wadah untuk pembuatan larutan sebaiknya disediakan dalam jumlah yang cukup (memadai) untuk pembuatan sampel, sehingga dalam pembuatan larutan (dalam praktek) lebih efisien.
2. Perlu ketelitian yang tinggi dalam melihat wadah agar benar-benar kering sehingga tidak menambah jumlah larutan yang akan dibuat.
3. Jumlah sampel yang diukur dan alat ukur yang dipakai harus benar-benar tepat sehingga tidak mempengaruhi konsentrasi yang diharapkan