

LAPORAN PRAKTIKUM
Analisa Tablet Vitamin C dengan HPLC
(High Performance Liquid Chromatography)

NAMA : 1. BINAYANTI NAINGGOLAN (NIM : 157008008)
2. HENNY GUSVINA B (NIM : 157008010)
3. DINNO RILANDO (NIM : 157008004)
HARI, TGL PRAKTIKUM : KAMIS, 30 JUNI 2016
TEMPAT PRAKTIKUM : 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 metode HPLC

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.

Dalam industri farmasi, HPLC secara rutin digunakan untuk menganalisis produk obat. Pabrik harus memastikan bahwa setiap produk memenuhi syarat yang ditentukan. Salah

satunya adalah produk vitamin C. Berbagai jenis tablet vitamin C yang tersebar dipasaran, maka untuk mengetahui kadar asam askorbat yang dikandung oleh vitaminC tersebut maka dipilih beberapa tablet C Vitamin (asam askorbat) untuk memastikan konsentrasi tablet Vitamin C tersebut sesuai label yang tercantum pada kemasan.

III. Alat dan bahan

Alat	Bahan
High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) Waters Alliance 2695 HPLC Separations Module Column Compartment & Water 2489 UV/Visible Detector dilengkapi dengan kolom C-18, diameter 5 μ l, ukuran 4,6 x 150 mm yang terhubung.	Tablet vitamin C sampel (IPI, Vitacimin, Vicee
Branson 5200 Ultrasonic Cleaner	Asam Askorbat
Labu ukur, tabung Erlenmeiye 10ml, 50ml dan 100ml	Aquadest
Mikropipet 100-1000 μ l dan tip	Metanol
Tabung reaksi, spuit, kertas saring (Millipore)	H ₂ O
Timbangan digital, lumping, Alu, Vial	H ₂ SO ₄ 6M

IV. Cara Kerja

a. Persiapan fase gerak Alat

1. Menyiapkan 500 mL larutan dimana 55% air dan methanol 45% kemudian menambahkan 6 tetes H₂SO₄6M.
2. Menghidupkan computer dan alat HPLC, set sesuai dengan rotokol alat HPLC tersebut dan sesuai dengan kondisi analisa yang digunakan



Gambar 1 : Alat HPLC Waters Alliance2695HPLCSeperationsModuleColumn Compartment & Water 2489UV/Visible Detector dilengkapi dengan kolom C-18, diameter 5 μ l, ukuran 4,6 x 150 mm yang terhubung dengan monitor

b. Pembuatan larutan induk Vitamin C (asam askorbat)

Pembuatan Larutan baku Vitamin C 1000 ppm. Siapkan larutan baku Vitamin C 1000 ppm sebanyak 50 ml menggunakan labu ukur 50 ml. Jumlah vitamin C yang harus ditimbang sebanyak 50 mg asam askorbat. Kemudian tambahkan aquidest sampai volume labu mencapai 50 ml. Bilas kertas atau wadah yang dipakai untuk menimbang. Kemudian tutup labu dan bolak – balik supaya bahan tercampur secara merata.



Gambar 2 : timbangan digital untuk menimbang berat bahan vitamin c

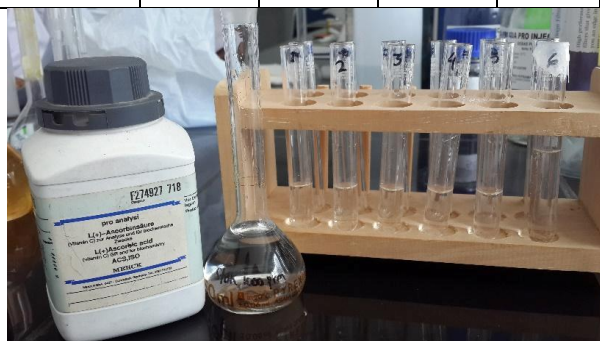
c. Pembuatan Serial Larutan Standard vitamin c (asam askorbat)

Cara doubling dilution

1. Siapkan 6 tabung reaksi dan beri tanda 1 s/d 6
2. Tambahkan masing – masing 2 ml akuadest pada tabung 2 s/d 6
3. Pada tabung 1 tambahkan 4 ml larutan stok
4. Pada tabung 2 tambahkan 2 ml larutan yang diambil dari tabung 1. Campur dengan baik
5. Pada tabung 3 tambahkan 2 ml larutan dari tabung 2. Campur dengan baik
6. Pada tabung 4 tambahkan 2 ml larutan dari tabung 3. Campur dengan baik
7. Pada tabung 5 tambahkan 2 ml larutan dari tabung 4. Campur dengan baik
8. Pada tabung 6 tambahkan 2 ml larutan dari tabung 5. Campur dengan baik

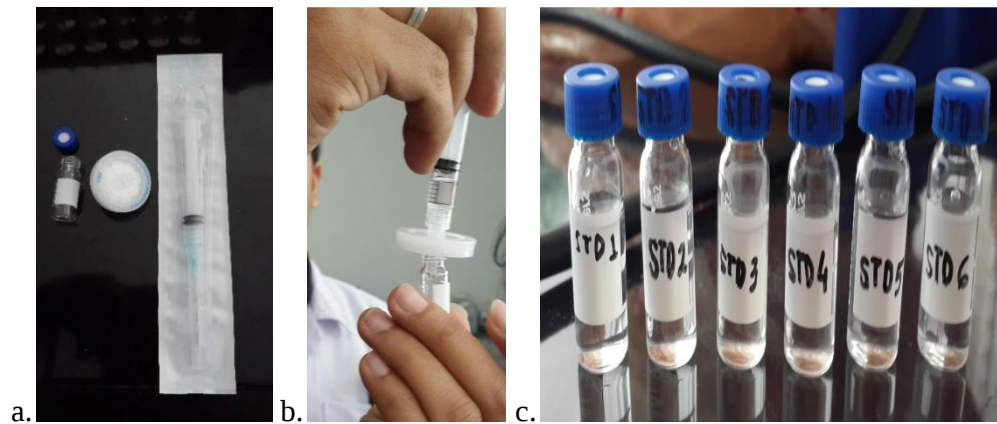
Tabel : doubling dilution asam askorbat 1000 ppm

Nomor Tabung	1	2	3	4	5	6
Pengenceran Asam askorbat	stok	1:1	1:3	1:7	1:15	1:31
Faktor	-	2	4	8	16	32
Konsentrasi	1000	500	250	125	62,5	31,25



Gambar 3: pembuatan dilution asam askorbat 1000 ppm ke dalam tabung 1 s/d 6

9. Masing – masing larutan disaring menggunakan Millipore dan dimasukkan ke vial 2 ml yang sudah diberi label dengan menggunakan spuit.



Gambar 4 : (a) spuit, Mili pore dan vial standar; (b) proses memasukkan larutan standard ke vial; (c) larutan standar yang siap dimasukkan untuk degassing setelah disaring dengan Millipore

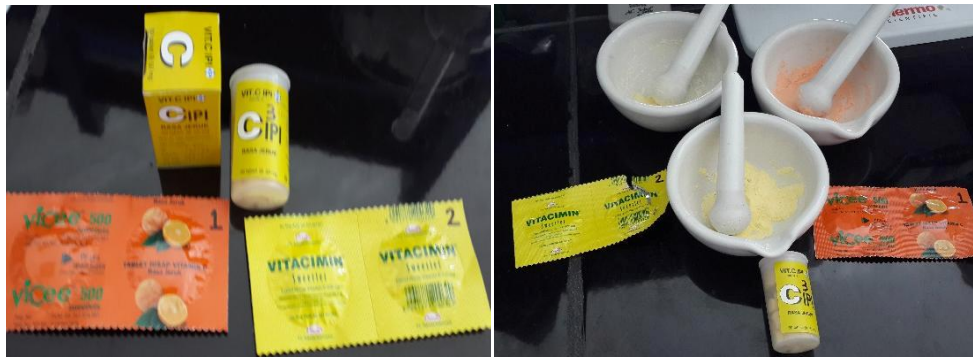
10. Kemudian vial yang sudah berisi larutan standard dimasukkan ke alat degassing Branson 5200 ultrasonic cleaner untuk dilakukan proses degassing selama ± 5 menit.



Gambar 5 : proses degassing dengan alat Branson 5200 ultasonic cleaner

d. Persiapan sampel

1. Siapkan beberapa tablet vitamin C berbeda (IPI, Vitacimin dan vice), gerus halus masing-masing tablet tersebut



Gambar 6: persiapan sampel 1 Vicee, sampel 2 vitacimin dan sampel 3 vit c IPI

2. Larutkan 300 mg vitamin C dalam akuadest dan diencerkan sampai 1000 mL
3. Ambil alikuot 10 mL larutan di atas dan diencerkan sampai 1000 mL dengan akuadest



Gambar 7 : larutan sampel 1, 2 dan 3 setelah dimasukkan ke dalam tabung

4. Larutan sampel disaring dengan Millipore dan ditampung dalam botol vial 2 ml, kemudian di degassing selama ± 5 menit.



Gambar 8 : larutan sampel yang sudah disaring dan dimasukkan ke Branson 5200 untuk proses degassing ± 5 menit

e. Menjalankan alat HPLC

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

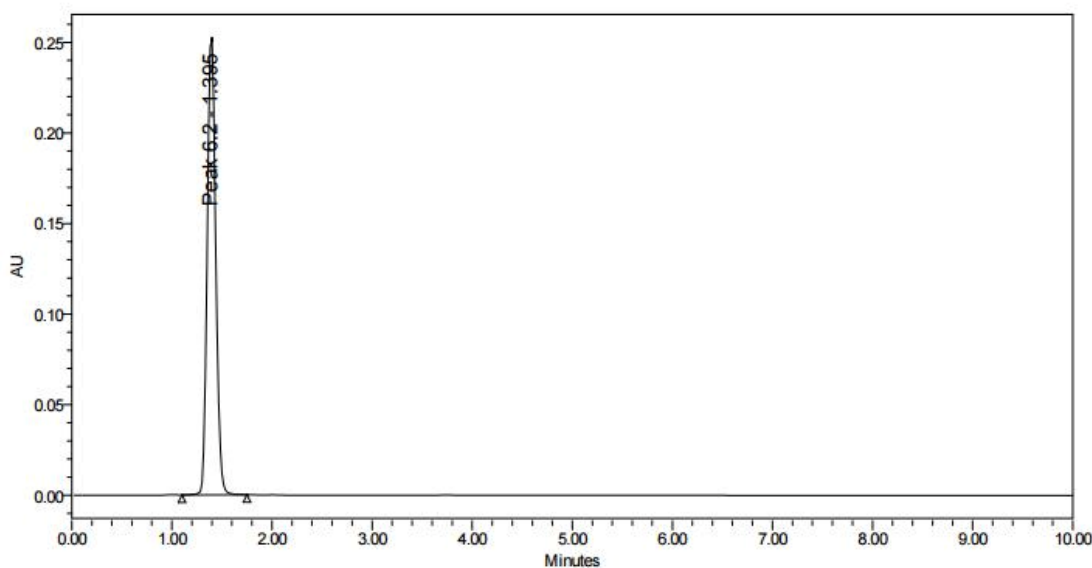


Gambar 9: Penyusunan vial didalam kolom HPLC dan monitor alat HPLC

f. Hasil dan pembahasan

Hasil pemeriksaan HPLC dari sampel tablet vitamin C dilakukan secara otomatis oleh program komputer dengan membandingkan nilai. Standard 1 s/d 6 dimasukkan untuk HPLC untuk memeriksa kadar vitamin C dengan konsentrasi yang berbeda – beda.

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

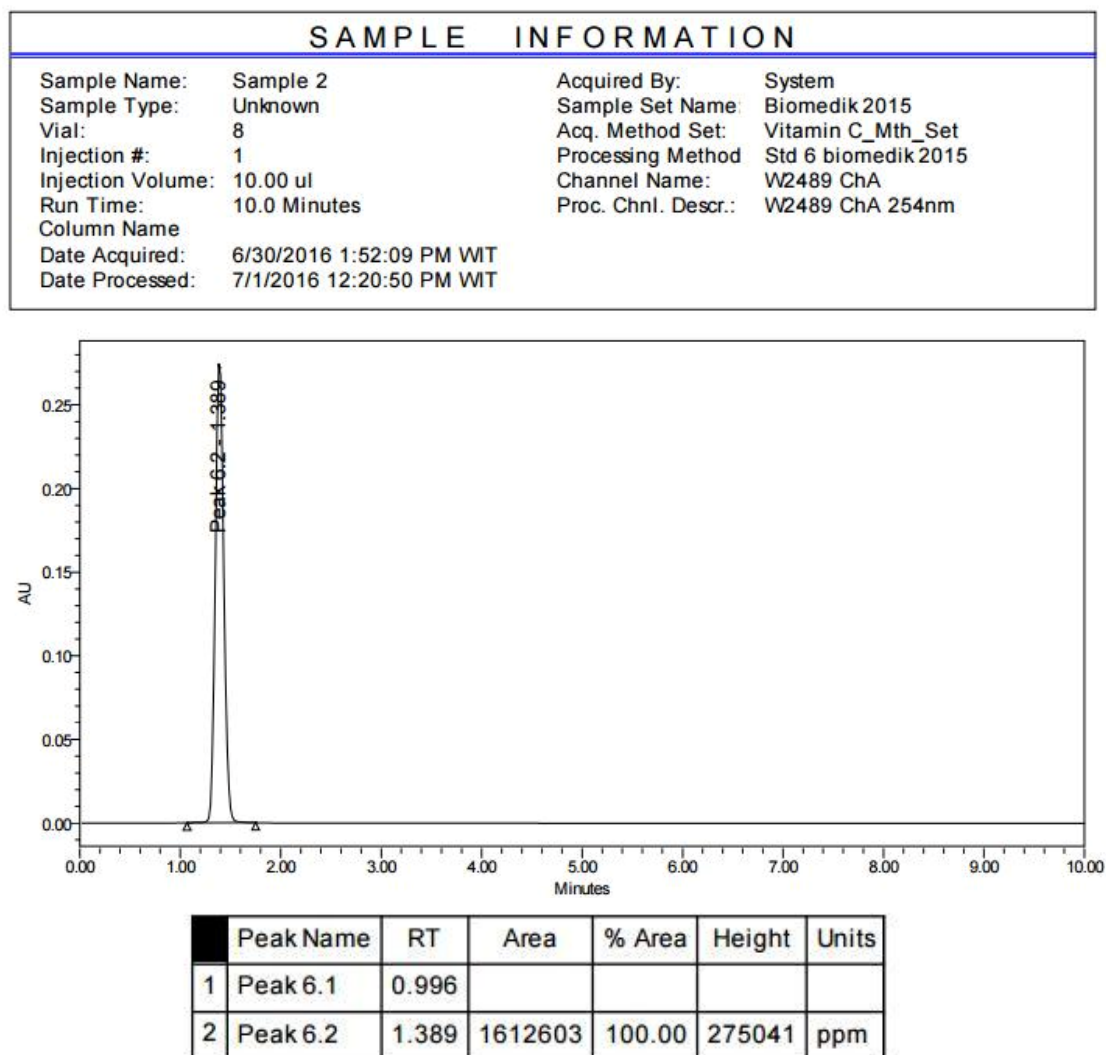
Gambar 10 : grafik kromatogram sampel 1 (Vicee)

Dari gambar 10 diatas 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).. Dari grafik diatas 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 μ AU. % Area pada sampel adalah 100%.

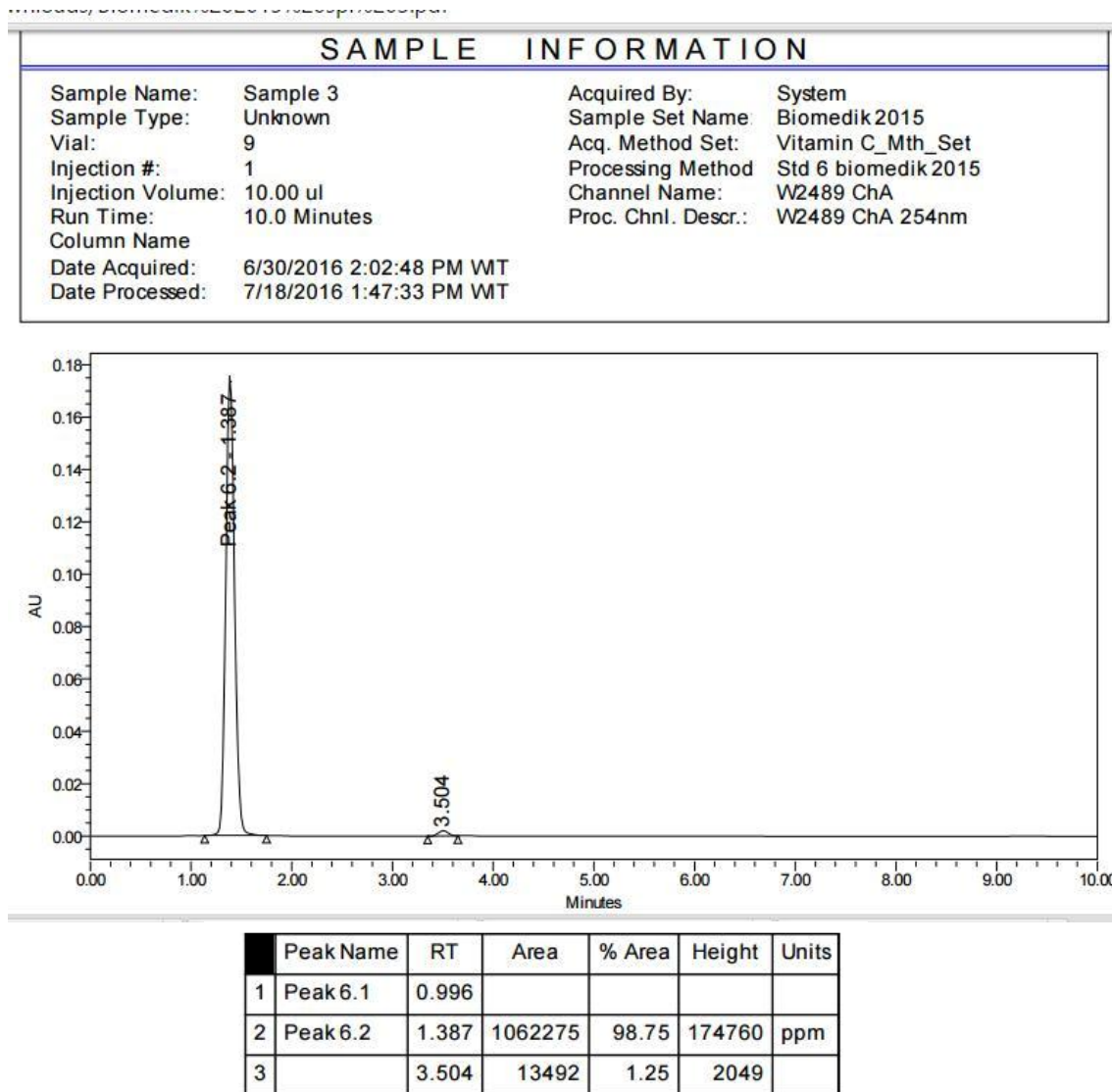
Larutan vitamin c yang dibuat pada sampel 1 adalah sebesar 300 g/1000 ml atau 300 g/l atau 300.000 ppm.



Gambar 11 : grafik kromatogram sampel 2 (Vitacimin)

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 μ AU. % Area pada sampel adalah

100%. Larutan vitamin c yang dibuat pada sampel 2 adalah sebesar 300 g/1000 ml atau 300gr/l atau 300.000 ppm Sementara kemurnian sampel adalah 100%. Jadi pada sampel yang ke dua kadar asam askorbat juga murni 100%



Gambar 12: grafik kromatogram sampel 3 (vit c IPI)

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 μ AU. % Area pada sampel adalah 98,75 %. 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%.

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 seluas 98,75%.

V. Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

1. HPLC atau High Performance Liquid Chromatography adalah suatu jenis pemeriksaan untuk mengidentifikasi secara kualitatif dan kuantitatif suatu molekul dalam kandungan tablet vitamin C dengan berbagai merk dengan cara memisahkan analit berdasarkan kepolarannya
2. Untuk mengidentifikasi suatu kadar vitamin c dalam beberapa tablet, diperlukan adanya larutan standar sebagai pembanding dengan hasil sampel
3. Hasil kromatografi HPLC disebut kromatogram. Sumbu X mewakili waktu retensi atau Retention Time (RT) sedangkan sumbu Y untuk absorbansi unit.
4. Untuk menghitung konsentrasi dapat digunakan luas area di bawah puncak peak atau ketinggian peak. Hasil kromatogram yaitu % area yang berfungsi untuk melihat kemurnian dari sampel. Apabila kadar sampel tidak murni maka akan muncul beberapa puncak (peak), larutan murni memiliki luas area 100%.

5. Luas area hasil kromatogram pada ketiga sampel vitamin c adalah yaitu sampel 1 (tablet VICE) 100%, sampel 2 (Tablet Vitacimin) 100% dan sampel 3 (Tablet vitamin C IPI) seluas 98,75% dan pada ditemukan puncak peak di tempat lain sehingga % luas area menjadi berkurang. Peak ini kemungkinan karena ada kotoran atau bahan lain yang tercampur kedalam larutan sampel 3.

Saran :

1. Praktikan harus lebih teliti dalam melakukan pengenceran dan penimbangan agar kesalahan yang terjadi pada saat praktikum dapat diminimalisasi.
2. Praktikan kurang paham langkah – langkah prosedur melakukan praktikum sehingga diharapkan kedepannya harus memahami prosedur sebelum praktikum.
3. Penting untuk lebih teliti dalam penimbangan bahan, penggerusan, pengenceran, melarutkan bahan dan penggunaan alat seperti mikropipet, Millipore, dll. Supaya diperoleh hasil yang akurat.