



dapat diakses melalui <http://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/jmuo>



Analisis Beberapa Asam Organik dengan Metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) *Grace Smart Rp 18 5 μ*

Lungguk Sitorus ^a, Julius Pontoh ^{a*}, Vanda Kamu ^a

^aJurusan Kimia, FMIPA, Unsrat, Manado

KATA KUNCI

asam organik
fase terbalik
HPLC

ABSTRAK

Metode HPLC fase terbalik dengan kolom *Grace Smart RP 18 5 μ* dapat digunakan untuk memisahkan dan menentukan konsentrasi asam-asam organik. Metode ini diaplikasikan suhu kolom 40 °C dan dideteksi pada panjang gelombang 210 nm dengan kalium dihidrogenfosfat (pH 2,8) sebagai fase gerak. Metode ini telah digunakan untuk menentukan asam-asam organik seperti asam malat, asam askorbat, asam laktat, asam asetat, asam sitrat, asam piroglutamat, dan asam fumarat.

KEYWORDS

organic acid
reverse phase
HPLC

ABSTRACT

Reverse phase HPLC method using *Grace smart RP 18 5 μ* can used to separating and calculating concentration of organic acid. This method did on 40 °C column temperature and detected on wavelength 210 nm with potassium dihydrogen phosphate (pH 2.8) as mobile phase. Determining of organic acids such as malic acid, ascorbic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, pyroglutamic acid and fumaric acid.

TERSEDIA ONLINE

29 Juli 2015

1. Pendahuluan

Asam organik adalah senyawa organik yang memiliki gugus karboksil (Theron dan Lues, 2010). Asam organik dapat diklasifikasikan berdasarkan tipe rantai karbon (Alifatik, Alisiklik, Aromatik, atau heterosiklik), kejenuhan, substitusi, dan nomor gugus fungsinya (Gomis, 2000). Keasaman dari suatu senyawa organik ditentukan oleh nilai pKa dari senyawa tersebut. Semakin kecil nilai pKa dalam senyawa organik, sehingga semakin tinggi tingkat keasamannya.

Asam organik banyak digunakan dalam industri makanan, industri kimia dan industri farmasi. Asam organik digunakan sebagai bahan pengasaman, bahan aditif antimikroba, pengembang rasa dalam bir dan wiski (Gomis, 2000), juga sebagai bahan pengawet (Theron dan Lues, 2010). Sejumlah kecil asam organik terdapat dalam tanaman sebagai senyawa antara dalam metabolisme (Haard dan Chism, 1996). Beberapa contoh asam organik yang ditemukan dalam makanan adalah asam malat,

asam laktat, asam fumarat, asam piroglutamat (Itoh et al., 1982), asam oksalat (Ergonul dan Nergiz, 2010), asam askorbat, asam sitrat dan asam tartrat (Nour et al., 2010).

Analisis asam-asam organik dapat dilakukan dengan cara titrasi, akan tetapi cara titrasi hanya bisa menentukan total asam organik sedangkan dalam buah-buahan terdapat banyak asam-asam organik. Metode analisis lain yang lebih baik untuk analisis asam organik adalah dengan menggunakan kromatografi.

Kromatografi adalah metode analisis yang menggunakan 2 fase (fase diam dan fase gerak) untuk memisahkan serangkaian senyawa kimia. Teknik ini dapat dilakukan dengan kromatografi lapis tipis, kromatografi cair dan kromatografi gas. Kelebihan analisis dengan kromatografi dibanding dengan titrasi adalah jumlah sampel yang dibutuhkan lebih sedikit dan dapat menganalisis berbagai jenis asam organik.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) adalah metode analisis yang

*Corresponding author: Jurusan Kimia FMIPA UNSRAT, Jl. Kampus Unsrat, Manado, Indonesia 95115; Email address: pontohjulius@yahoo.co.id

banyak dilaporkan untuk analisis asam organik. Teknik HPLC dibedakan atas fase normal (menggunakan pelarut nonpolar sebagai fase gerak), fase terbalik (menggunakan pelarut polar sebagai fase gerak) dan penukar ion (menggunakan gradien konsentrasi ion dalam fase geraknya). Analisis asam organik dalam buah-buahan telah dilaporkan oleh Nour et al., (2010) menggunakan HPLC fase terbalik dengan kolom C18 sebagai fase diam dengan larutan fosfat 50 mM sebagai fase gerak, juga telah dilaporkan oleh Ergonul dan Nergiz (2010) analisis buah zaitun dengan kolom penukar ion dan asam fosfat 0.1 % (w/v) sebagai fase gerak dan Itoh et al., (1982) melaporkan analisis asam organik pada nira aren menggunakan kromatografi penukar ion dengan asam fosfat 0.05% sebagai fase gerak. Namun demikian, Itoh et al., (1982) melakukan persiapan sampel yang lebih kompleks dengan mengekstraksi nira menggunakan metode soxlet.

Pada saat ini Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi telah memiliki HPLC dengan kolom Grace smart RP 18 5 μ dengan detektor UV-VIS, namun belum diketahui apakah peralatan ini dapat digunakan untuk analisis asam organik pada buah duku dan langsung. Penelitian ini akan dilakukan untuk mengembangkan kolom Grace smart RP 18 5 μ .

2. Material dan Metode

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah HPLC Cecil CE4201, uv detector SPD- 20A, pompa LC- 20AD, oven kolom Grace smart RP 18 5 μ (panjang kolom 15 cm dan diameter 4,6 mm), pHmeter, blender, alat-alat gelas secara umum pyrex, schott Duran, pipet, mikro pipet, aluminium foil, botol serum, labu ukur 100 mL dan 1000 mL. Bahan yang digunakan adalah Kalium dihidrogen fosfat, aquades, asam asetat 10%, asam sitrat, asam malat, asam laktat 10%, asam piroglutamat, asam fumarat, saringan Whatman 0.2 μ m, dan Whatman 0.45 μ m.

2.1. Pembuatan Kurva Standar Asam Organik

2.1.1. Asam Malat

Disiapkan larutan stok asam Malat konsentrasi 2% (dengan melarutkan asam Malat sebanyak 2 g dalam 100 mL buffer fosfat). Selanjutnya disiapkan 4 botol vial, masing- masing diisi dengan asam stok sebanyak 0.2 mL, 0.5 mL, 1 mL dan 2 mL, selanjutnya ditambahkan dengandengan larutan fosfat hingga 5 mL dan disimpan pada suhu \pm 4 $^{\circ}$ C selama proses penelitian. Dari kosentrasi asam organik standar, dibuat kurva standar (Luas area vs kosentrasi).

2.1.2. Asam Laktat

Disiapkan larutan stok asam Laktat konsentrasi 1% yaitu dengan menambahkan 1 mL asam Laktat kedalam 90 mL buffer fosfat kemudian ditambahkan larutan buffer sampai 100 mL, selanjutnya disiapkan 3 buah botol vial, masing-

masing diisi dengan asam stok sebanyak 0.2 mL, 0.5 mL, 1 mL dan 2 mL, selanjutnya ditambahkan dengan larutan fosfat hingga 5 mL dan disimpan pada suhu \pm 4 $^{\circ}$ C selama proses penelitian. Dari kosentrasi asam organik standar, dibuat kurva standar (Luas area vs kosentrasi).

2.1.3. Asam Asetat

Disiapkan larutan stok asam Asetat konsentrasi 1% yaitu dengan menambahkan 1 mL asam Asetat kedalam 90 mL buffer fosfat kemudian ditambahkan larutan buffer sampai 100 mL, selanjutnya disiapkan 3 buah botol vial, masing-masing diisi dengan asam stok sebanyak 0.2 mL, 0.5 mL, 1 mL dan 2 mL, selanjutnya ditambahkan dengan larutan fosfat hingga 5 mL dan disimpan pada suhu \pm 4 $^{\circ}$ C selama proses penelitian. Dari kosentrasi asam organik standar, dibuat kurva standar (Luas area vs kosentrasi).

2.1.4. Asam Sitrat

Disiapkan larutan stok asam Sitrat konsentrasi 0.1% (dengan melarutkan asam Sitrat sebanyak 0.1 g dalam 100 mL buffer fosfat). Selanjutnya disiapkan 4 buah botol vial, masing-masing diisi dengan asam stok sebanyak 0.2 mL, 0.5 mL, 1 mL dan 2 mL, selanjutnya ditambahkan dengan larutan fosfat hingga 5 mL dan disimpan pada suhu \pm 4 $^{\circ}$ C selama proses penelitian. Dari kosentrasi asam organik standar, dibuat kurva standar (Luas area vs kosentrasi).

2.1.5. Asam Piroglutamat

Disiapkan larutan stok asam Piroglutamat konsentrasi 0.1% (dengan melarutkan asam Piroglutamat sebanyak 0.1 g dalam 100 mL buffer fosfat). Selanjutnya disiapkan 4 buah botol vial, masing-masing diisi dengan asam stok sebanyak 0.2 mL, 0.5 mL, 1 mL dan 2 mL, selanjutnya ditambahkan dengan larutan fosfat hingga 5 mL dan disimpan pada suhu \pm 4 $^{\circ}$ C selama proses penelitian. Dari kosentrasi asam organik standar, dibuat kurva standar (Luas area vs kosentrasi).

2.1.6. Asam Fumarat

Disiapkan larutan stok asam Fumarat konsentrasi 0.1% (dengan melarutkan asam Fumarat sebanyak 0.1 g dalam 100 mL buffer fosfat). Selanjutnya disiapkan 4 buah botol vial, masing-masing diisi dengan asam stok sebanyak 0.2 mL, 0.5 mL, 1 mL dan 2 mL, selanjutnya ditambahkan dengan larutan fosfat hingga 5 mL dan disimpan pada suhu \pm 4 $^{\circ}$ C selama proses penelitian. Dari kosentrasi asam organik standar, dibuat kurva standar (Luas area vs kosentrasi).

2.1.7. Asam Askorbat

Disiapkan larutan stok asam Askorbat konsentrasi 0.4% (dengan melarutkan vitamin C sebanyak 0.4 g dalam 100 mL buffer fosfat). Selanjutnya disiapkan 4 buah botol vial, masing-masing diisi dengan asam stok sebanyak 0.2 mL, 0.5 mL, 1 mL dan 2.66 mL, selanjutnya ditambahkan dengan larutan fosfat hingga 4 mL dan disimpan pada suhu \pm 4 $^{\circ}$ C selama proses

penelitian. Dari konsentrasi asam organik standar, dibuat kurva standar (Luas area vs konsentrasi).

2.2. Analisis HPLC (Nour et al., 2010)

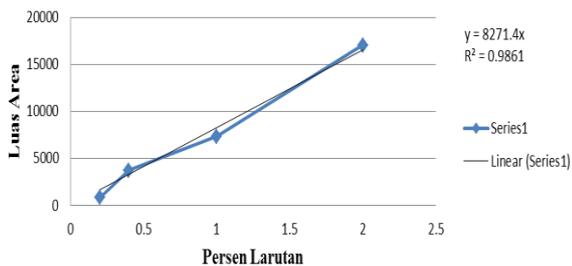
Standar asam organik buah duku dan langsung yang akan digunakan dalam penelitian ini dianalisis dengan kromatografi fasa terbalik menggunakan kolom *Grace smart RP 18 5 μ* , dan dibaca pada $\lambda = 210$ nm. Sebelum diinjeksi kedalam HPLC, standar asam organik dan sampel disaring terlebih dahulu dengan kertas *whatman 0.2 μ m*.

Analisis dilakukan pada kondisi isokratik pada suhu 40 °C dengan menggunakan larutan fosfat 50 mM sebagai fasa gerak (melarutkan 6.8 g kalium dihidrogen fosfat dalam 900 mL air, nilai pH diatur dengan menambahkan asam fosfat sampai 2.8 menggunakan pH meter, lalu ditambahkan dengan air hingga 1000 mL), selanjutnya disaring dengan kertas *whatman 0.45 μ m*. laju alir fasa gerak diatur 0.7 mL/menit. Sebelum dilakukan injeksi, alat harus distabilkan terlebih dahulu.

3. Hasil dan Pembahasan

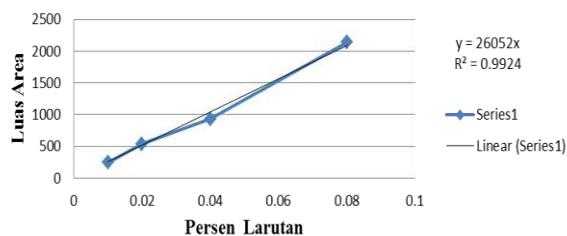
3.1. Kurva Standar Asam Organik

Kurva standar asam malat ditampilkan pada Gambar 1. Standar asam malat ini dibuat dengan variasi konsentrasi 0.2%, 0.4%, 1% dan 2% yang diplotkan dengan luas area dari masing-masing konsentrasi dan menghasilkan kurva yang tidak cukup linear dengan koefisien korelasi sebesar 0.986 dengan nilai respons sebesar 8271 mA persent asam malat.



Gambar 1. Kurva standar asam malat

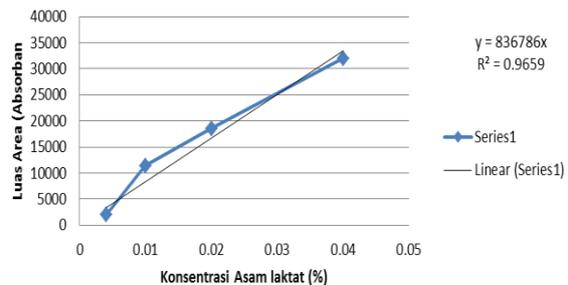
Gambar 2 menampilkan kurva standar untuk asam askorbat. Variasi konsentrasi asam standar untuk asam askorbat dimulai dengan konsentrasi 0,016% 0,04% 0,08% dan 0.16%.



Gambar 2. Kurva standar asam askorbat

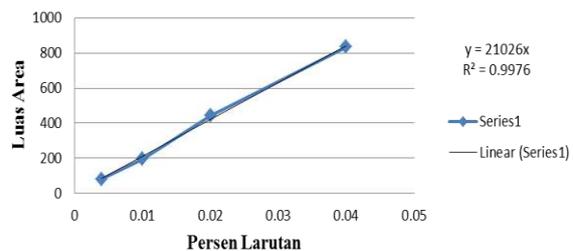
Penggunaan konsentrasi variasi tersebut disesuaikan dengan luas area dari asam organik dalam sampel untuk mempermudah dalam perhitungan konsentrasi asam organik dalam sampel. Koefisien korelasi untuk asam askorbat sebesar 0,992.

Linearitas kurva standar asam laktat dapat dilihat pada Gambar 3 dan koefisien korelasi sebesar 0,966 dan merupakan kurva yang kurang linear. Standar asam laktat yang digunakan pada penelitian ini berbentuk cairan sehingga variasi konsentrasi dari asam laktat dinyatakan dalam v/v. Adapun variasi konsentrasi untuk asam laktat dibuat dengan mengambil 0.004%, 0.01%, 0.02% dan 0.04%.



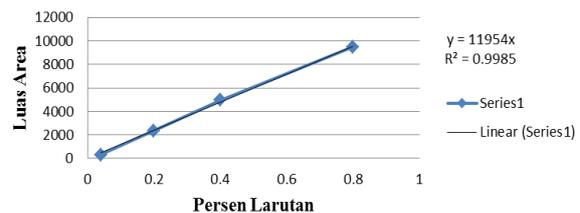
Gambar 3. Kurva standar asam laktat

Pada gambar 4 ditampilkan kurva standar dari asam sitrat dengan koefisien korelasi sebesar 0.997 yang menunjukkan linearitas yang baik. Variasi konsentrasi asam sitrat dimulai dengan 0.004%, 0.01%, 0.02% dan 0.04%.



Gambar 4. Kurva standar asam sitrat

Pada gambar kurva standar asam asetat diperoleh linearitas yang cukup baik (Gambar 5) sebesar 0,998. Variasi konsentrasi pada asam asetat sama halnya dengan konsentrasi pada asam laktat yaitu 0.004%, 0.01%, 0.02% dan 0.04%.

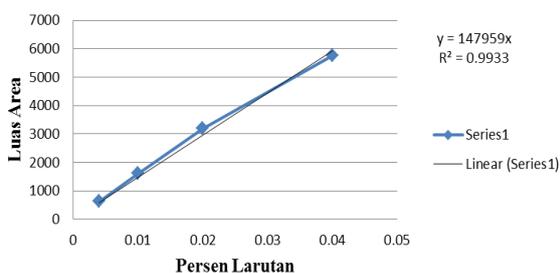


Gambar 5. Kurva standar asam asetat

Ditinjau dari variasi konsentrasi dan luas area dari beberapa asam organik standar yaitu asam asetat, asam laktat dan asam malat, ketiganya

memiliki tingkat sensitifitas yang hampir sama. Tingkat sensitifitas dapat dilihat dari seberapa besar luas area dan tinggi puncak yang diperoleh dari konsentrasi tertentu. Sensitifitas yang tinggi jika menghasilkan luas area dan puncak yang besar, padahal konsentrasi yang digunakan adalah kecil. Sedangkan sensitifitas yang rendah jika luas area dan puncak yang diperoleh pada kromatogram adalah kecil sedangkan konsentrasi yang digunakan besar.

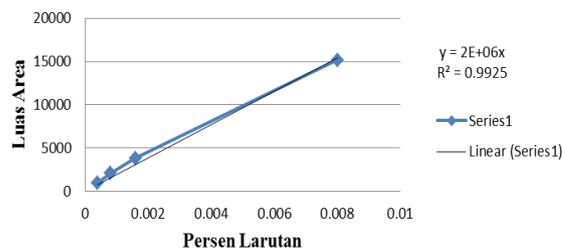
Gambar 6 menunjukkan kurva standar asam piroglutamat yang memberikan koefisien korelasi sebesar 0.993. Variasi konsentrasi untuk asam piroglutamat adalah 0.004%, 0.01%, 0.02% dan 0.04%, meskipun linearitas yang di berikan cukup baik akan tetapi nilai korelasi yang di berikan tidak terlalu cukup baik. Hal ini disebabkan pembacaan luas area yang cukup tinggi pada konsentrasi 0.04%, dimana asam piroglutamat merupakan asam organik yang memiliki sensitivitas yang tinggi.



Gambar 6. Kurva standar asam piroglutamat

Asam fumarat adalah asam standar yang dibuat dengan konsentrasi yang paling rendah di bandingkan asam standar lainnya, yaitu dimulai dengan konsentrasi 0.0004% karena pada konsentrasi tersebut sudah menghasilkan puncak dengan luas area sebesar 983.4, variasi konsentrasi selanjutnya adalah 0.0008%, 0.0016% dan 0.008%. Pada Gambar 7 kurva standar yang diberikan kurang cukup baik yaitu koefisien korelasi sebesar 0.992. Konsentrasi asam fumarat dinyatakan dalam g.mL⁻¹ sama halnya dengan asam

malat, asam askorbat, asam sitrat dan asam piroglutamat karena asam-asam standar tersebut berbentuk bubuk yang selanjutnya diencerkan dengan buffer fosfat untuk pembuatan variasi konsentrasi.



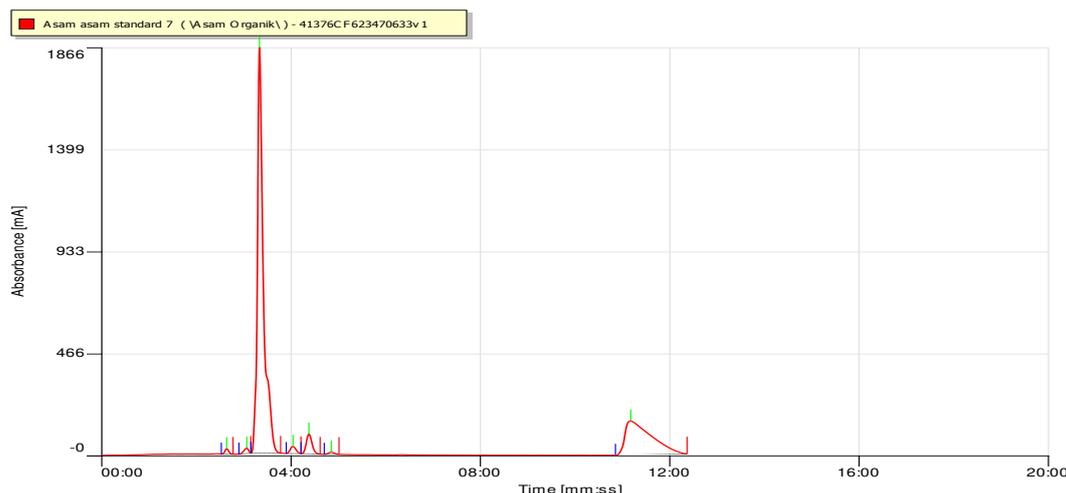
Gambar 7. Kurva standar asam fumarat

3.2. Respon Asam-asam Organik

Untuk menentukan keberadaan beberapa senyawa organik dalam sampel buah duku dan langsung, dibutuhkan standar dari asam-asam organik. Asam-asam organik standar ini dianalisis dengan HPLC menggunakan kolom *Grace smart RP 18 5µ* dengan laju alir 0.7 mL/menit serta suhu kolom *Grace smart RP 18 5µ* 40 °C dan panjang gelombang 210 nm.

Tabel 1. Volume larutan asam-asam standar yang dianalisis dengan HPLC

| Asam Organik | Volume Larutan (mL) | Persen Larutan (%) |
|-------------------|---------------------|--------------------|
| Asam Malat | 1 | 0.4 |
| Asam Askorbat | 1 | 0.04 |
| Asam Laktat | 1 | 0.04 |
| Asam Asetat | 1 | 0.4 |
| Asam Sitrat | 1 | 0.1 |
| Asam Piroglutamat | 1 | 0.01 |
| Asam Fumarat | 1 | 0.0016 |



Gambar 8. Kromatogram asam-asam standar

Waktu retensi (t_r) dari campuran asam-asam organik standar ditampilkan pada Tabel 2. Kromatogram (Gambar 8) dari campuran asam-asam organik inilah yang digunakan untuk analisis beberapa senyawa organik dalam ekstrak buah duku dan langsung yang dilihat berdasarkan perbedaan waktu retensinya (t_r). Campuran asam-asam organik standar ini dibuat dengan mencampurkan masing-masing 1 mL dari semua asam-asam standar yang telah di analisis dengan HPLC *Grace smart RP 18 5 μ* dengan persen larutan yang berbeda (Tabel 1).

Tabel 2. Waktu retensi asam-asam organik yang dianalisis dengan HPLC

| Asam Organik | λ (nm) | t_r (Menit) |
|-------------------|-------------------|------------------|
| Asam Malat | 210 | 2.41 |
| Asam Askorbat | 210 | 3.08 |
| Asam Laktat | 210 | 3.20 |
| Asam Asetat | 210 | 3.27 |
| Asam Sitrat | 210 | 4.08 |
| Asam Piriglutamat | 210 | 4.27 |
| Asam Fumarat | 210 | 4.56 |

Waktu retensi dari asam laktat hasil penelitian ini berbeda dengan waktu retensi asam laktat yang ditampilkan oleh hasil penelitian Limo (2015) yang menggunakan analisis kromatografi dengan kolom YMC Triat C₁₈, yaitu asam laktat memiliki $t_r = 7.31$.

4. Kesimpulan

Berdasarkan tujuh asam organik yang digunakan (asam malat, asam askorbat, asam laktat, asam asetat, asam sitrat, asam piroglutamat dan asam fumarat), asam-asam organik yang terdeteksi menggunakan HPLC Cecil CE4201 dengan kolom *Grace smart RP 18 5 μ* . Terdapat

beberapa puncak yang belum teridentifikasi apakah senyawa asam organik atau bukan sehingga metode ini masih perlu dioptimalkan.

Daftar Pustaka

- Ardianingsih, R. 2009. Penggunaan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dalam Proses Analisa Deteksi Ion. *Berita Dirgantara*.**10**: 101-104
- Day R. A.Jr., and Underwood A.L.2001. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Erlangga. Jakarta
- Fessenden, R. J., and J. S. Fessenden.1986. *Kimia Organik*. Edisi ke-3.Erlangga. Jakarta
- Gomis, D. B. 2000. HPLC analysis of organic acids. Di dalam : Nollet, L. M. L. (ed). *Food Analysis by HPLC*. CRC Press, New York
- Haard, N. F., and G. W. Chism. 1996. Characteristic Of Edible Plant Tissues. Di dalam: Fennema, O. R. *Food Chemistry*. CRC Press, New York
- Itoh, T., C. H. Widjaja, A. Matsuyama, M. Z. Nasution, and J. Kumendong. 1982. Compositional Characteristics of Nira-Palm Juice of High Sugar Content From Palm Tree. Di dalam: *Agricultural Production and Processing Technology. Proceeding of IPB-JICA International Symposium*, Bogor. Hlm 233-240
- Nour, V., I. Trandafir, and M. E. Ionica. 2010. HPLC Organic Acid Analysis In Different Citrus Juice Under Reversed Phase Condition. *NotulaeBotanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*.**11**: 42-48
- Shepard, L. 2012. *Relating Sensory and Chemical Properties to Consumer Acceptance of Sour Cream : Organic Acid* [thesis]. Faculty of North Carolina State University, North Carolina
- Theron, M. M., and J. F. R. Lues. 2010. *Organic Acids and Food Preservation*. CRC press, New York *The Journey of Chemistry*.2012.*High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. [27 Februari 2012]