



Research Articles

Optimasi penggunaan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) untuk analisis asam askorbat guna menunjang kegiatan Praktikum Bioteknologi Kelautan

Novi Angraini^{1*}, Putri Desmaniar²

¹Jurusan Ilmu Kelautan, FMIPA Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

²Program Studi Ilmu Farmasi, FMIPA Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

Received 08 April 2020; Accepted 21 Mei 2020; Published 4 Juni 2020

Keyword: HPLC; Mangrove; Ascorbic Acid; Marine Biotechnology	ABSTRACT: Marine Biotechnology Practicum is one of the practicums in the Department of Marine Sciences, FMIPA Universitas Sriwijaya. One of the materials available is extract analysis by HPLC. Extracts derived from marine products such as mangroves will be analyzed for their antioxidant content by HPLC. HPLC with the reverse phase method can be used to determine ascorbic acid as an antioxidant in marine product samples. This method was applied using a C18 column of 150 mmL x 46 mm.d and detected at a wavelength of 264 nm with a mobile phase of 0.1% acetic acid and 60: 40 methanol. This method will support the activities of Marine Biotechnology Practicum at the Department of Marine Sciences FMIPA in topic of the extract content analysis material by HPLC. @2020 Published by UP2M, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sriwijaya University
Kata Kunci: HPLC; Mangrove; Asam Askorbat; Bioteknologi Kelautan	ABSTRAK: Praktikum Bioteknologi Kelautan merupakan salah satu praktikum yang ada di Jurusan Ilmu Kelautan FMIPA Universitas Sriwijaya. Salah satu materi yang ada adalah analisis ekstrak dengan HPLC. Ekstrak yang berasal dari produk laut seperti mangrove akan dianalisis kandungan antioksidannya dengan HPLC. HPLC dengan metode fase terbalik dapat digunakan untuk menentukan asam askorbat sebagai salah satu antioksidan pada sampel produk laut. Metode ini diaplikasikan dengan menggunakan kolom C18 ukuran 150 mmL x 46 mm.d dan dideteksi pada panjang gelombang 264 nm dengan fase gerak campuran asam asetat 0.1 % dan metanol 60 : 40. Metode ini akan menunjang kegiatan Praktikum Bioteknologi Kelautan yang ada pada Jurusan Ilmu Kelautan FMIPA Unsri pada materi analisis kandungan ekstrak dengan HPLC. @2020 Published by UP2M, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sriwijaya University

* Corresponding author.

E-mail address: angraininovi311@gmail.com

PENDAHULUAN

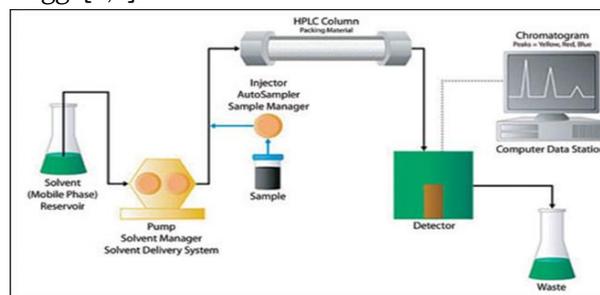
Laboratorium Bioekologi Kelautan merupakan salah satu laboratorium yang ada di bawah Jurusan Ilmu Kelautan FMIPA Unsri. Di dalam buku Tata Kelola Laboratorium Bioekologi Laut tahun 2017 dituangkan beberapa mata praktikum yang berkaitan dengan ilmu bioekologi yang dilakukan di laboratorium ini. Salah satu praktikum yang dilakukan adalah praktikum bioteknologi kelautan. Bioteknologi Kelautan merupakan salah satu teknik pemanfaatan biota laut untuk kebutuhan pembuatan atau modifikasi produk, memperbaiki kualitas genetik dari tumbuhan atau hewan laut serta mengembangkan (merekayasa) organisme untuk kebutuhan tertentu termasuk perbaikan lingkungan. Jadi praktikum ini bertujuan untuk melatih mahasiswa dalam mengembangkan teknologi penemuan-penemuan baru yang berasal dari produk-produk laut seperti adanya kandungan antioksidan pada beberapa produk laut untuk digunakan sebagai salah satu bahan tambahan sediaan obat atau kosmetik. Dari segi pengembangan teknologi digunakan alat laboratorium kategori III untuk proses analisis yaitu HPLC.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah salah satu instrument yang dipakai untuk teknik analisis pemisahan secara kualitatif, kuantitatif, pemisahan/isolasi dan pemurnian. Kromatografi pertama kali ditemukan oleh Tsweet pada tahun 1903, dimana Tsweet berhasil melakukan pemisahan pigmen dari daun dengan menggunakan kolom berisi kapur (CaSO_4). Tsweet juga menciptakan istilah kromatografi untuk menggambarkan daerah berwarna yang bergerak menuju bawah kolom.

Adanya proses adsorpsi dinamis dimana molekul analit akan bergerak melewati celah berpori merupakan prinsip dasar HPLC. Material kolom (fase diam) akan berinteraksi dengan komponen sampel sehingga terjadi pemisahan. Lamanya waktu interaksi (retention time) dipengaruhi oleh kekuatan interaksi dari material kolom dan komponen sampel.

HPLC menggunakan dua fase kerja yaitu fase gerak (mobile phase) dan fase diam (stationary phase). Fase gerak berupa cairan atau pelarut yang berfungsi untuk membawa komponen

campuran menuju detektor sedangkan fase diam adalah fase tetap didalam kolom berupa partikel dengan pori yang kecil dan memiliki area surface tinggi [1,8].



Gambar 1. Diagram Alir HPLC

Fase gerak ditampung dalam reservoir. Botol kaca merupakan jenis reservoir yang paling umum digunakan. Dari reservoir, fase gerak akan dialirkan secara terus menerus dengan kecepatan alir yang tetap oleh pompa. Pengaturan kecepatan alir fase gerak dilakukan dengan menggunakan program dalam HPLC. Kemudian sampel diinjeksikan melalui injektor dan akan terbawa oleh fase gerak menuju kolom. Didalam kolom akan terjadi proses pemisahan dimana komponen sampel akan ditahan oleh fase diam kemudian akan larut oleh fase gerak yang terus menerus dialirkan sehingga melewati kolom untuk menuju ke detektor. Detektor akan mendeteksi adanya komponen sampel didalam kolom dan menghitung kadarnya sehingga keluar dalam bentuk angka pada layar komputer.

Hutan mangrove adalah hutan yang terdapat di daerah pesisir yang sangat dipengaruhi oleh pasang surut air laut. Spesies pohon dan semak yang mampu hidup pada air asin atau payau merupakan tanaman yang mendominasi hutan mangrove. Di masyarakat, hutan mangrove dikenal juga sebagai hutan payau atau hutan bakau. Ternyata keduanya berbeda. Hutan bakau adalah hutan yang diisi oleh genus *Rhizophora* sedangkan hutan mangrove diisi oleh banyak genus dan jenis tumbuhan lainnya. Hutan mangrove mempunyai peranan penting dalam menjaga garis pantai untuk menghindari pengikisan (abrasi) serta dapat meredam hantaman gelombang besar (tsunami).

Asam Askorbat (L-Ascorbic Acid) adalah nutrisi yang penting dan dibutuhkan oleh manusia dan hewan karena memiliki aktivitas sebagai vitamin C [2,7]. Asam askorbat terbentuk secara

alami dalam tubuh jika terjadi pertemuan didalam sel dan mengalami perubahan bentuk karena adanya pengaruh pH.

Termasuk kedalam golongan vitamin antioksidan, vitamin C mempunyai kemampuan untuk menangkal berbagai radikal bebas ekstraselular [3,9]. Karakteristik vitamin C yaitu sangat mudah teroksidasi oleh panas, cahaya dan logam sehingga apabila dipanaskan terlalu lama akan menyebabkan vitamin C mudah rusak.

Menurut [3], kandungan vitamin C di alam banyak ditemukan pada berbagai jenis sayuran dan buah-buahan seperti lemon, jeruk nipis, apel, dan nenas. Tubuh seseorang membutuhkan vitamin C sampai 1000 mg atau lebih setiap harinya dari dosis yang dianjurkan berkisar 60-90 mg perhari [3,4]. Seseorang yang mengalami kekurangan kandungan vitamin C akan menderita bibir pecah-pecah atau sariawan dan menyebabkan tubuh menjadi lemas. Akan tetapi kelebihan kandungan vitamin C di dalam tubuh juga dapat menyebabkan gangguan yaitu tubuh akan menjadi kurus dan pucat [3].

Kadar asam askorbat pada berbagai produk dapat diketahui dengan beberapa metode analisis antara lain dengan metode titrasi, metode DPPH dengan spektrofotometer Uv-Vis dan dengan metode HPLC. Metode yang paling sering digunakan adalah metode titrasi dan metode DPPH dengan spektrofotometer Uv-Vis [5,10].

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah bahan-bahan pro analisis seperti L-Ascorbic Acid (Merck) sebagai standar, Etanol 70 %, Acetic Acid Glisial (Merck), Metanol p.a (Merck), Aquabidest dan Aquadest.

Alat yang digunakan yaitu seperangkat alat HPLC (Shimadzu), Rotary Evaporator (Stuart), Neraca analitik (Nimbus, ADAM), seperangkat alat vakum, kertas saring whatman 0,45 μ m, dan peralatan gelas laboratorium kimia (Iwaki Pyrex).

Prosedur Penelitian

Pembuatan Ekstrak Mangrove *Rhizopora apiculata*

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menghaluskan mangrove *Rhizopora apiculata* dengan menggunakan mesin penghalus

kecepatan sedang. Serbuk mangrove kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 70 % selama 1 x 24 jam. Maserat kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring lalu di evaporasi dengan rotary evaporator pada suhu dibawah 60 °C sehingga diperoleh ekstrak mangrove dalam bentuk pasta.

Pembuatan Fase Gerak Dan Larutan Pengencer

Fase gerak yang dipakai merupakan campuran asam asetat 0.1 % dan metanol dengan perbandingan 60:40 (v/v) [10]. Pembuatan asam asetat 0.1 % dilakukan dengan memipet asam asetat glacial sebanyak 0.5 mL dimasukkan kedalam labu ukur 500 mL diencerkan dengan aquabidest sampai tanda batas lalu homogenkan. Larutan pengencer adalah campuran metanol aquabidest 70:30 (v/v) dibuat dengan mencampurkan 70 mL metanol dan 30 mL aquabidest lalu dihomogenkan. Fase gerak dan larutan pengencer kemudian disaring dengan kertas saring whatman 0.45 μ m.

Pembuatan Larutan Induk Asam Askorbat Dan Larutan Standar

Pembuatan larutan induk asam askorbat dilakukan dengan menimbang standar L-Ascorbic Acid sebanyak 50 mg lalu dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, larutkan dengan larutan pengencer, cukupkan sampai tanda batas dan homogenkan (konsentrasi larutan induk 500 ppm). Dari larutan induk 500 ppm diencerkan menjadi beberapa konsentrasi larutan standar yaitu 300 ppm, 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, dan 0 ppm. Selama proses penelitian, larutan induk dan larutan standar disimpan pada suhu ± 4 °C.

Persiapan Larutan Uji

Timbang ± 0.5 gram ekstrak mangrove, masukkan ke labu ukur 25 mL lalu larutkan dengan larutan pengencer sebanyak 20 mL. Lakukan ultrasonic selama 15 menit kemudian tambahkan larutan pengencer sampai tanda batas dan homogenkan. Selanjutnya saring filtrat menggunakan saringan dengan membrane filter ukuran 0,45 μ m, diameter 13 mm. Sampel siap di injeksikan.

Prosedur Analisa Kadar Asam Askorbat

Larutan standard dan larutan uji masing-masing sebanyak 20 μL diinjeksikan dengan menggunakan syringe 50 μL ke dalam alat HPLC. Kondisi alat HPLC pada saat analisa diatur sebagai berikut:

Kolom : Shimpack VP ODS C18
 Fase gerak : Asam asetat 0.1 % dan metanol perbandingan 60:40
 Kecepatan Alir : 1.0 mL/menit
 Detektor : Uv dengan panjang gelombang 264 nm

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel berupa mangrove *Rhizopora apiculata* diambil dari daerah estuari Tanjung Api-Api. Mangrove jenis ini dipilih dengan alasan jenis ini paling banyak ditemui dan mudah didapatkan di daerah estuari Tanjung Api-Api.

Sampel mangrove *Rhizopora Apiculata* yang dikumpulkan dimasukkan ke dalam kantong plastik untuk kemudian di preparasi di laboratorium.

Sebanyak 5 kilogram sampel daun *Rhizopora Apiculata* di kering udarkan. Lalu di haluskan dengan menggunakan blender dengan kecepatan sedang hingga menjadi serbuk halus. Serbuk halus kemudian di rendam dengan etanol 70 % selama 1 x 24 jam (proses maserasi). Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring. Ampas sisa penyaringan direndam kembali dengan etanol 70 % selama 1 x 24 jam lalu disaring kembali. Proses maserasi ini dilakukan

secara berulang hingga cairan hasil saringan jernih.

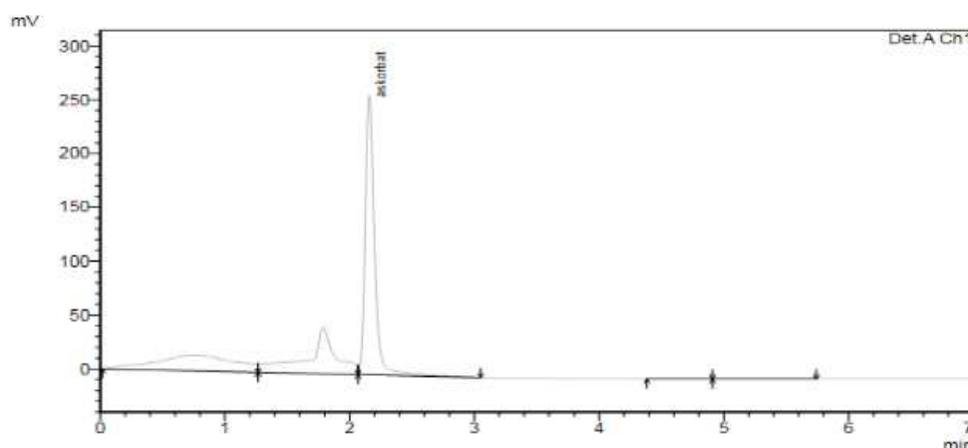
Hasil saringan kemudian di evaporasi dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu dibawah 60 oC hingga diperoleh ekstrak kental. Dari 2,5 liter hasil penyaringan didapatkan ekstrak kental \pm 1,5 gram. Selanjutnya ekstrak disimpan dalam lemari pendingin sampai digunakan pada tahap selanjutnya.

Analisis Asam Askorbat Dengan HPLC

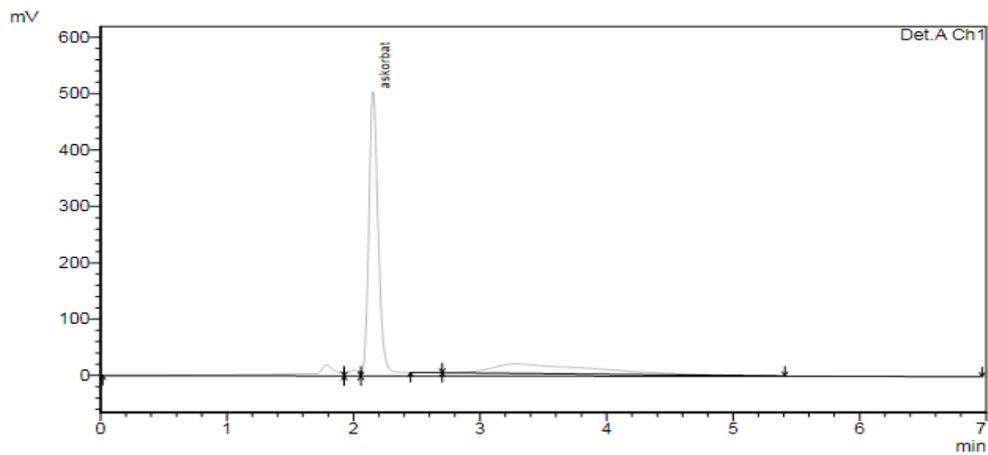
Asam askorbat dianalisis dengan fase gerak asam asetat 0.1 % dan metanol dengan perbandingan 60:40 [10]. Gambar 2. menunjukkan kromatogram dari larutan standar asam askorbat 100 ppm (volume injeksi 20 μL) pada kondisi operasi seperti yang tertera pada Tabel 1. Gambar 3. menunjukkan grafik hubungan luas area dan konsentrasi dari larutan standar asam askorbat. Gambar 4. menunjukkan kromatogram asam askorbat pada sampel mangrove *Rhizopora apiculata*. Ekstrak sampel dilarutkan dalam larutan pengencer metanol aquabidest 70:30 dan disaring dengan menggunakan kertas saring 0.45 μm . Sampel diinjeksikan untuk analisis sebanyak 20 μL .

Tabel 1. Kondisi analisis

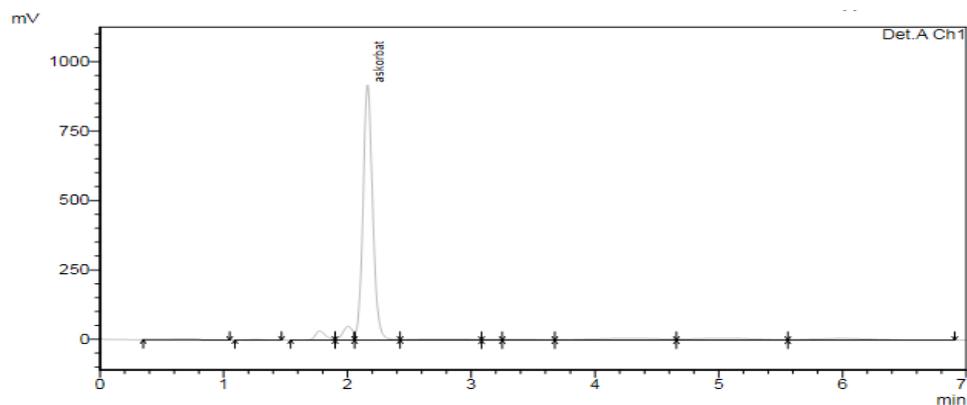
Column	: Shim-pack VP ODS (150 mmL. x 4.6 mmi.d)
Mobile Phase	: Asam asetat 0.1 % dan metanol (60:40)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Detection	: 264 nm



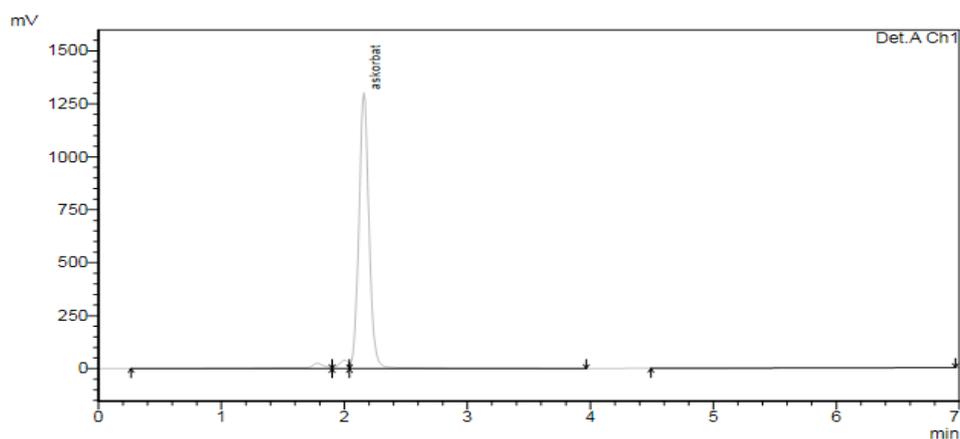
Gambar 2. Kromatogram standar askorbat 50 ppm pada 264 nm. Fase diam : C18 panjang 150 mm, diameter 4,6 mm dan fase gerak Asam asetat 0.1 % dan metanol (60:40)



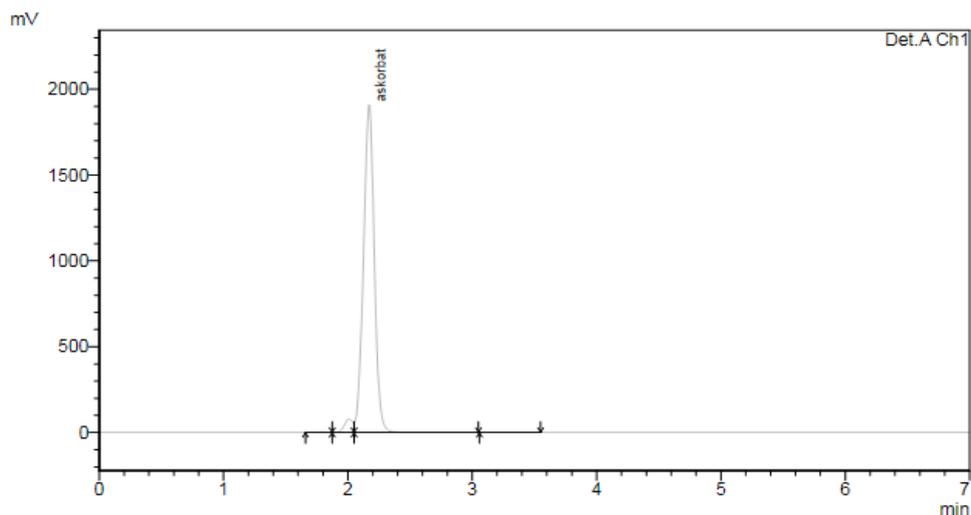
Gambar 3. Kromatogram standar askorbat 100 ppm pada 264 nm. Fase diam : C18 panjang 150 mm, diameter 4,6 mm dan fase gerak Asam asetat 0.1 % dan metanol (60:40)



Gambar 4. Kromatogram standar askorbat 200 ppm pada 264 nm. Fase diam : C18 panjang 150 mm, diameter 4,6 mm dan fase gerak Asam asetat 0.1 % dan metanol (60:40)

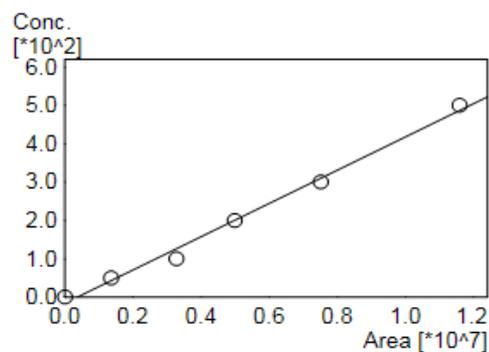


Gambar 5. Kromatogram standar askorbat 300 ppm pada 264 nm. Fase diam : C18 panjang 150 mm, diameter 4,6 mm dan fase gerak Asam asetat 0.1 % dan metanol (60:40)

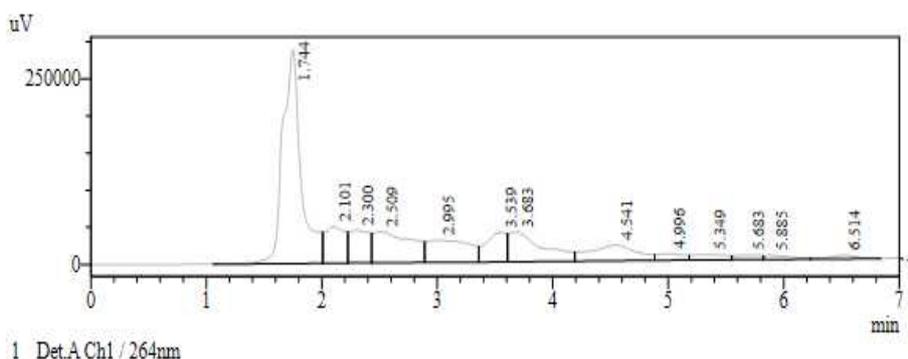


Gambar 6. Kromatogram standar askorbat 500 ppm pada 264 nm. Fase diam : C18 panjang 150 mm, diameter 4,6 mm dan fase gerak Asam asetat 0.1 % dan metanol (60:40)

Pada gambar 2, 3, 4, 5, dan 6 terlihat bahwa titik puncak (peak) standar asam askorbat berbagai konsentrasi muncul pada retention time 2.150 menit. Retention time inilah yang akan dijadikan acuan penentuan peak asam askorbat pada sampel.



Gambar 7. Grafik hubungan luas area dan konsentrasi larutan standar asam askorbat



Gambar 8. Kromatogram sampel mangrove *Rhizophora apiculata*. Fase diam : C18 panjang 150 mm, diameter 4,6 mm dan fase gerak asam asetat 0.1 % dan metanol (60:40). Diukur pada panjang gelombang 264 nm.

Dari gambar 8. diketahui bahwa asam askorbat pada sampel muncul pada retention time 2.101 menit dimana retention time ini sama dengan retention time asam askorbat standar. Sehingga dapat dinyatakan bahwa peak yang muncul merupakan asam askorbat. Luas area

yang tampak pada kromatogram menunjukkan konsentrasi asam askorbat yang terdapat dalam sampel yang dianalisis. Kadar asam askorbat dalam sampel dapat dihitung dengan cara menginterpolasikan luas area yang didapat ke dalam persamaan yang didapat dari kurva

standar. Hasil pengukuran asam askorbat pada sampel dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengukuran sampel

Sampel	Retention Time (menit)	Kadar asam askorbat (ppm)
Rhizopora Apiculata	2.101	9.021

Dari Tabel 2. dapat dilihat bahwa kadar asam askorbat pada sampel mangrove *Rhizopora apiculata* adalah 9.021 ppm dengan retention time 2.101 menit. Sebaiknya ditambahkan pembahasan dengan membandingkan hasil ini dengan beberapa referensi yang ada.

KESIMPULAN

Kadar asam askorbat pada mangrove *Rhizopora apiculata* yang dianalisis dengan HPLC adalah 9.021 ppm. Dengan teridentifikasinya kadar asam askorbat sebagai salah satu antioksidan yang terdapat dalam mangrove jenis *Rhizopora Apiculata* dengan menggunakan HPLC menunjukkan bahwa HPLC yang ada di laboratorium Jurusan Ilmu Kelautan bisa dioptimalkan penggunaannya untuk kegiatan praktikum Bioteknologi Kelautan pada materi analisis antioksidan dengan HPLC.

REFERENSI

- [1] Shimadzu Document. *Analysis of Water Vitamins Using The Prominence System*. Shimadzu HPLC Application Report No.24. —
- [2] Wadge.2003. *Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals*. Food Standart Agency.
- [3] Almatsier, S. 2001. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- [4] Khairina, D. 2008. *Faktor-faktor yang berhubungan dengan status gizi*. Jakarta : FKM UI.
- [5] Techinamuti N dkk. Review : *Metode Analisis Kadar Vitamin C*. Jurnal Farmaka Suplemen Volume 16 Nomor 12. Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran.
- [6] Sitorus, L dkk. 2015. *Analisis Beberapa Asam Organik dengan Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Grace Smart Rp 18 5 μ* . Jurusan Kimia, FMIPA, Unsrat, Manado.
- [7] Deman, John, M. 1997. *Kimia Makanan*. Bandung : Penerbit ITB.
- [8] Gazdik, Zbynek, dkk. 2008. *Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrochemical Detection*. Journal Sensors 2008, 8, 7097-7112; DO; 10.3390/s8117097.
- [9] Adriana, dkk. 2010. *HPLC Analysis of Vitamin B3 and Vitamin C from A Dairy Product Containing Brewer's Yeast*. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies 2010, 16 (2), 136-140.
- [10] Razc, dkk. 1990. *HPLC Method For Determination Of Ascorbic Acid In Fruits And Vegetables*.hemistry, Technical University, H-1521, Budapest.