

**ANALISIS KADAR ASAM ASKORBAT DAN ASAM  
BENZOAT DALAM MINUMAN RINGAN DENGAN HPLC  
MENGUNAKAN FASA GERAK METANOL  
DAN BUFFER ASETAT**

**SKRIPSI**

*Diajukan kepada Tim Penguji Skripsi Jurusan Kimia sebagai salah satu  
persyaratan Guna memperoleh Gelar Sarjana Sains*



**Oleh:  
RANI SANJAYA  
02066/2008**

**PROGRAM STUDI KIMIA  
JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
2012**

**PERSETUJUAN SKRIPSI**

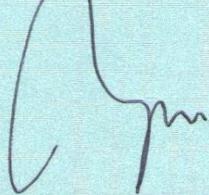
**ANALISIS KADAR ASAM ASKORBAT DAN ASAM BENZOAT DALAM  
MINUMAN RINGAN DENGAN HPLC MENGGUNAKAN FASA GERAK  
METANOL DAN BUFFER ASETAT**

**Nama : Rani Sanjaya**  
**NIM : 02066**  
**Program Studi : Kimia**  
**Jurusan : Kimia**  
**Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

**Padang, 06 Agustus 2012**

**Disetujui Oleh**

**Pembimbing I,**



**Budhi Oktavia, M.Si, Ph.D.**  
**NIP.19721024 199803 1 001**

**Pembimbing II,**



**Drs. Bahrizal, M.Si**  
**NIP.19551231 198903 1 009**

## PENGESAHAN

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi  
Program Studi Kimia Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Negeri Padang

Judul : ANALISIS KADAR ASAM ASKORBAT DAN ASAM  
BENZOAT DALAM MINUMAN RINGAN DENGAN  
HPLC MENGGUNAKAN FASA GERAK METANOL  
DAN BUFFER ASETAT

Nama : Rani Sanjaya

NIM : 02066

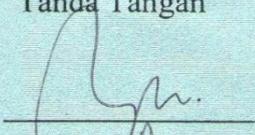
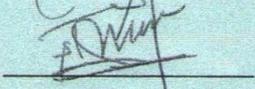
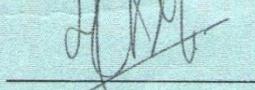
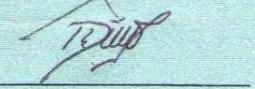
Program Studi : Kimia

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 06 Agustus 2012

### Tim Penguji

	Nama	Tanda Tangan
1. Ketua	: Budhi Oktavia, M.Si, Ph.D	1. 
2. Sekretaris	: Drs. Bahrizal, M.Si	2. 
3. Anggota	: Drs. Amrin, M.Si	3. 
4. Anggota	: Dr. Hardeli, M.Si	4. 
5. Anggota	: Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si	5. 

## **SURAT PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar karya sendiri. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis atau diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti cara penulisan karya ilmiah yang lazim.

Padang, 06 Agustus 2012

Penulis

**Rani Sanjaya**

## Halaman Persembahan

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan berucap syukur kepada ALLAH SWT yang telah memberikan ridhonya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Karya sederhana ini ku persembahkan untuk :

Kedua orang tua ku (Alm papa) dan mama tercinta, my brother dan my sister, khususnya buat kak rina sanjaya

Dosen pembimbing ku pak Budhi dan Pak Bahrizal....

Semua Dosen Kimia dan Staff jurusan serta Staff Lab yang sudah membantu

Buat teman<sup>2</sup> Kimia NK 08, special to "Ciqidunk"

Buat Fahmi Rahman.....

Terima Kasih untuk semua doa, dukungan, bantuan, yang telah diberikan untuk ku.

sanjaya\_rani

## ABSTRAK

**Rani Sanjaya (2012): Analisis Kadar Asam Askorbat dan Asam Benzoat Dalam Minuman Ringan Dengan HPLC Menggunakan Fasa Gerak Metanol dan Buffer Asetat**

Telah dilakukan penelitian untuk menentukan kondisi optimum untuk pemisahan dan penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat yang berperan sebagai pengawet dalam minuman ringan yang beredar di pasaran dan di lingkungan sekolah dengan menggunakan HPLC.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum HPLC yang menggunakan fasa gerak metanol dan buffer asetat berada pada laju alir 1 ml/mnt, Kolom ODS C<sub>18</sub>,  $\lambda = 240$  nm, pH 3.5, dilakukan secara elusi gradien yang dimulai pada komposisi fasa gerak 5:95 hingga 50:50 selama 5 menit dengan waktu retensi untuk asam askorbat adalah 3.73 menit dan 11.07 menit untuk asam benzoat. Dari hasil uji kadar sampel minuman ringan yang dijual di lingkungan sekolah tidak ditemukan asam askorbat dan asam benzoat sebagai bahan pengawet, sedangkan untuk minuman ringan yang beredar di pasaran dari 5 sampel yang diuji ditemukan sampel yang mengandung asam benzoat yang melebihi batas maksimum yang diizinkan yang terdapat pada sampel C yaitu 676 ppm, sedangkan kadar yang diizinkan menurut SNI 01-0222-1995 untuk asam benzoat adalah 600 ppm, sedangkan untuk kandungan asam askorbat terbanyak terdapat pada sampel A yaitu 2869 ppm.

*Kata kunci: Asam askorbat, asam benzoat, HPLC*

## **KATA PENGANTAR**

Puji syukur penulis ucapkan kehadirat ALLAH SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-NYA kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tugas akhir yang berjudul “ Analisis Kadar Asam Askorbat dan Asam Benzoat dalam Minuman Ringan dengan HPLC Menggunakan Fasa Gerak Metanol dan Buffer Asetat”. Skripsi ini diajukan untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar sarjana sains, Jurusan Kimia, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Seluruh penulisan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan berbagai pihak yang telah memberikan dorongan, bantuan moril, serta bimbingan. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Budhi Oktavia, M.Si, Ph.D., selaku Pembimbing I, dan sebagai Ketua Program Studi Kimia.
2. Bapak Drs. Bahrizal, M.Si , selaku pembimbing II dan selaku Penasehat Akademik.
3. Bapak Drs. Amrin, M.Si sebagai Penguji pada ujian akhir ini.
4. Bapak Dr. Hardeli, M.Si sebagai Penguji pada ujian akhir ini.
5. Ibu Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si sebagai Penguji pada ujian akhir ini.
6. Ibu Dra. Andromeda, M.Si sebagai Ketua Jurusan Kimia.
7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Negeri Padang.

8. Teman- teman yang telah banyak memberikan bantuan dan memberi semangat penulis hingga selesainya skripsi ini.

Penulis sangat mengharapkan adanya kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini.

Padang, Agustus 2012

Rani Sanjaya

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	i
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	ii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	viii
 <b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Batasan Masalah.....	3
1.3 Rumusan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
 <b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Asam Askorbat.....	5
2.2 Asam Benzoat .....	8
2.3 Metoda Analisis Kromatografi.....	9
2.4 HPLC .....	10

2.5 Sistem Peralatan HPLC.....	
2.5.1 Sistem Pompa.....	12
2.5.2 Sistem Detektor.....	13
2.5.3 Injektor.....	13
2.5.4 Fasa Gerak.....	14
2.5.5 Fasa Diam.....	15

### **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	16
3.2 Alat dan Bahan.....	16
3.3 Cara Kerja.....	
1. Sampling Minuman.....	16
2. Pembuatan Larutan Asam Benzoat dan Asam Askorbat.....	17
3. Pembuatan Buffer Asetat.....	17
3.4 Penentuan Kondisi Optimum.....	
a. Panjang Gelombang Optimum Secara Spektrofotometri..	18
b. Penentuan pH Optimum Buffer Sebagai Fasa Gerak.....	18
c. Penentuan Komposisi Fasa Gerak Optimum.....	19
3.5 Pembuatan Kurva Kalibrasi.....	19
3.6 Penentuan Kadar Sampel Dengan HPLC.....	19

### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN..... 20**

### **BAB V KESIMPULAN DAN SARAN..... 33**

### **DAFTAR PUSTAKA..... 35**

### **LAMPIRAN..... 36**

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Asam Askorbat.....	6
2. Struktur Asam Benzoat .....	9
3. Skema Peralatan HPLC.....	12
4. Spektrogram Asam Askorbat 50 ppm.....	21
5. Spektrogram Asam Benzoat 50 ppm .....	21
6. Kromatogram Penentuan pH Optimum .....	22
7. Kromatogram Penentuan Komposisi Fasa Gerak .....	24
8. Kromatogram Blanko dan Larutan Standar .....	25
9. Kurva Kalibrasi Asam Askorbat .....	26
10. Kurva Kalibrasi Asam Benzoat.....	28
11. Kromatogram Kurva Kalibrasi Asam Askorbat dan Asam Benzoat .....	29
12. Kromatogram Sampel Minuman Ringan di Pasaran.....	31
13. Kromatogram Sampel Minuman Ringan di Sekolah .....	32

## **DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
1. Pembuatan Buffer Asetat .....	18
2. Data Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Askorbat .....	26
3. Data Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Benzoat .....	27
4. Data Hasil Pengukuran Kadar Sampel di Pasaran .....	30

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Penentuan $\lambda$ maks asam askorbat dan asam benzoate.....	36
2. Penentuan pH optimum.....	37
3. Penentuan kondisi optimum fasa gerak.....	38
4. Penentuan Kadar Asam askorbat dan Asam Benzoat.....	39
5. Data pengukuran kurva kalibrasi asam askorbat.....	40
6. Data pengukuran kurva kalibrasi asam benzoat.....	41
7. Perhitungan persamaan regresi asam askorbat.....	42
8. Perhitungan persamaan regresi asam benzoat.....	43
9. Rumus perhitungan dan hasil pengukuran kadar sampel.....	44

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar belakang**

Semakin berkembangnya ilmu pengetahuan saat ini, tingkat pengetahuan tentang teknik pemisahan pun semakin meningkat. Salah satu teknik pemisahan yang sering digunakan adalah kromatografi. Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fasa gerak dan fasa diam untuk memisahkan komponen yang berada pada larutan.

Saat ini teknik kromatografi yang paling banyak digunakan untuk fasa cair adalah kromatografi cair kinerja tinggi ( KCKT) atau biasa dikenal dengan *High Performance Liquid Chromatography* ( *HPLC*). Karena analisa dengan HPLC cepat, daya pisah baik, persiapan sampel mudah dan dapat dihubungkan dengan detektor yang sesuai.

HPLC dapat digunakan untuk mengisolasi zat tidak mudah menguap dan zat yang secara termal tidak stabil (Khopkar, 2003:168). HPLC juga dapat digunakan untuk penentuan zat-zat organik yang ada di dalam makanan seperti asam askorbat dan asam benzoat.

Asam benzoat merupakan suatu bahan pengawet yang sering digunakan di dalam minuman ringan. Bahan pengawet merupakan bahan kimia yang berfungsi untuk memperlambat kerusakan makanan baik yang disebabkan mikroba pembusuk, bakteri, ragi, maupun jamur dengan cara menghambat, mencegah, menghentikan proses pembusukkan dan fermentasi dari bahan makanan.

Pemakaian asam benzoat dari satu sisi menguntungkan karena dengan penambahan asam benzoat makanan dan minuman dapat dibebaskan dari mikroba pembusuk, namun dari sisi lain, penggunaan asam benzoat sebagai pengawet dapat menimbulkan efek buruk terhadap kesehatan bagi pemakainya apabila kadar pemakaian bahan pengawet tidak diatur dan diawasi.

Asam askorbat merupakan suatu antioksidan yang juga termasuk bahan pengawet. Zat ini ditambahkan untuk mencegah timbulnya bau tengik pada makanan yang mengandung minyak dan lemak. Asam askorbat merupakan salah satu vitamin yang larut di dalam air. Asam askorbat banyak dijumpai didalam buah-buahan dan sayur-sayuran terutama dalam keadaan segar (Iryani, 2003:80).

Beberapa metoda untuk penentuan vitamin C atau asam askorbat telah dilakukan, diantaranya yaitu dengan metoda titrasi menggunakan dikloroindofenol, namun metoda ini mempunyai kelemahan diantaranya bahan makanan yang mengandung senyawa-senyawa yang dapat mereduksi zat warna selain vitamin C, dan batas akhir titrasi yang tidak jelas, terutama adanya ekstrak yang mengandung pigmen (Adnan, 1997).

Penentuan kadar asam benzoat dengan metoda HPLC sebelumnya telah dilakukan dengan menggunakan fasa gerak metanol dan buffer fosfat secara elusi isokratik dan didapatkan waktu retensi yang lama untuk asam benzoat (Arif, 2011). Untuk itu perlu dicari kondisi optimum pada penggunaan HPLC dalam menentukan kadar asam askorbat dan asam benzoat agar diperoleh hasil yang lebih baik. Pada penelitian ini kondisi optimum diperoleh dengan memvariasikan pH dan komposisi fasa gerak sehingga diperoleh pH dan komposisi fasa gerak

optimum serta melakukan elusi gradien agar diperoleh waktu retensi yang lebih pendek untuk asam benzoat.

## **1.2 Batasan masalah**

Adapun batasan masalah yang akan diteliti dalam penelitian ini adalah

1. Sampel minuman ringan diambil dari beberapa minuman ringan yang dijual bebas di pasaran dan di lingkungan sekolah.
2. Penentuan kadar asam benzoat dan asam askorbat dengan menggunakan HPLC dengan menggunakan pelarut metanol dan buffer asetat dengan memvariasikan pH dan komposisi fasa gerak.
3. Membandingkan kadar asam benzoat dalam sampel minuman ringan dengan standar yang telah ditetapkan.

## **1.3 Perumusan masalah**

Adapun rumusan masalah yang akan diteliti dalam penelitian ini adalah

1. Bagaimana kondisi optimum HPLC dengan menggunakan pelarut metanol:buffer asetat untuk penentuan asam askorbat dan asam benzoat?
2. Berapa kadar asam askorbat dan asam benzoat dalam sampel minuman ringan?

#### **1.4 Tujuan penelitian**

Adapun tujuan penelitian ini adalah

1. Menentukan kondisi optimum pada penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat secara HPLC menggunakan pelarut metanol:buffer asetat dengan memvariasikan pH dan komposisi Fasa Gerak.
2. Menentukan kadar asam askorbat dan asam benzoat dalam sampel minuman ringan.

#### **1.5 Manfaat penelitian**

Penelitian ini memberikan manfaat pada perkembangan iptek dalam bidang kimia, khususnya kimia analitik yaitu memberikan cara mudah menganalisa untuk penentuan asam askorbat dan asam benzoat serta dapat melihat apakah minuman tersebut layak dikonsumsi atau tidak.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

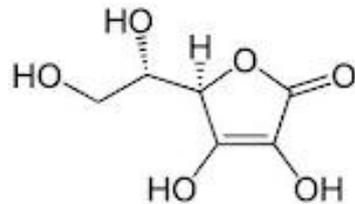
#### **2.1 Asam Askorbat (Vitamin C)**

Asam askorbat (vitamin C) adalah suatu turunan heksosa dan diklasifikasikan sebagai karbohidrat yang erat berkaitan dengan monosakarida. Vitamin C dapat disintesis dari D-glukosa dan D-galaktosa dalam tumbuh-tumbuhan dan sebagian besar hewan. Vitamin C terdapat dalam dua bentuk di alam, yaitu L-asam askorbat (bentuk tereduksi) dan L-asam dehidro askorbat (bentuk teroksidasi).

Vitamin C ditemukan dalam semua jaringan hidup dan sebagian besar hewan dapat mensintesis vitamin C dari glukosa dalam tubuhnya. Asam askorbat sangat mudah teroksidasi secara reversibel menjadi asam L-Dehidroaskorbat. Asam L-Dehidroaskorbat ini sangat labil dan dapat berubah menjadi asam L-diketogulonat.

Penyerapan vitamin C berlangsung di usus halus melalui transport aktif. Apabila seseorang mengkonsumsi vitamin C 30-180 mg setiap harinya maka usus akan menyerapnya kira-kira 80-90% dari jumlah yang masuk. Jika seseorang mengkonsumsi vitamin C dalam jumlah yang tinggi maka efek sampingnya terjadi diare. Kelebihan vitamin C didalam tubuh akan dibuang bersama urin, tubuh hanya mampu menahan vitamin C dalam jumlah yang sedikit (Iryani, 2003:79).

Struktur kimia asam askorbat dapat dilihat pada Gambar 1



Gambar 1. Struktur Asam Askorbat

### Sejarah

Penyakit *scurvy* telah dikenal sejak abad ke-15, yaitu penyakit yang banyak di derita oleh pelaut yang berlayar selama berbulan-bulan serta bertahan dengan makanan yang dikeringkan dan biskuit. Penyakit ini menyebabkan pucat, rasa lelah berkepanjangan diikuti oleh perdarahan gusi, perdarahan dibawah kulit, edema, tukak, dan pada akhirnya kematian.

Pada tahun 1750, Lind, seorang dokter dari Skotlandia menemukan bahwa *scurvy* dapat dicegah dan diobati dengan memakan jeruk. Baru pada tahun 1932 Szen-Gyorgyi dan C. Glenn King berhasil mengisolasi zat antiskorbut dari jaringan adrenal, jeruk, dan kol yang dinamakan vitamin C. Zat ini kemudian berhasil disintesis pada tahun 1933 oleh Haworth dan Hirst sebagai asam askorbat (Sunita, 2004 : 185).

### Sifat

Vitamin C adalah kristal putih yang mudah larut dalam air. Dalam keadaan kering vitamin C cukup stabil, tetapi dalam keadaan larut, vitamin C mudah rusak karena bersentuhan dengan udara (oksidasi) terutama bila terkena panas. Oksidasi

dipercepat dengan kehadiran tembaga dan besi. Vitamin C tidak stabil dalam larutan alkali, tetapi cukup stabil dalam larutan asam. Vitamin C adalah vitamin yang paling labil.

### **Fungsi**

Vitamin C mempunyai banyak fungsi di dalam tubuh, sebagai koenzim atau kofaktor. Asam askorbat adalah bahan yang kuat kemampuan reduksinya dan bertindak sebagai antioksidan dalam reaksi-reaksi hidroksilasi. Beberapa turunan vitamin C (seperti asam eritrobik dan askorbik palmitat) digunakan sebagai antioksidan di dalam industri pangan untuk mencegah proses menjadi tengik, perubahan warna pada buah-buahan dan untuk mengawetkan daging (Sunita, 2004 : 187).

Fungsi utama vitamin C adalah untuk mensintesis kolagen intra seluler. Kolagen adalah protein yang banyak terdapat dalam jaringan konektif, tulang dan pembuluh darah. Vitamin C memegang peranan penting dalam hidroksilasi prolin menjadi hidroksi prolin dan lisin menjadi hidroksilisin. Kedua senyawa ini adalah sangat penting dalam pembentukan kolagen (Iryani, 2003:80).

### **Sumber Vitamin C**

Vitamin C banyak dijumpai didalam buah-buahan dan sayur-sayuran terutama dalam keadaan segar. Buah yang terlalu matang kandungan vitamin C nya lebih rendah dibanding yang mentah. Vitamin C terdapat dalam tanaman seperti bayam, brokoli, cabe hijau, jeruk, nanas, dan lain-lain. Vitamin C yang bersumber dari hewan adalah susu, telur, daging, ikan, dan unggas. Konsumsi vitamin C yang dianjurkan adalah 60 mg/hari. Defisiensi vitamin C dapat

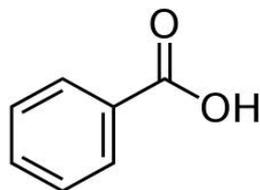
menyebabkan sariawan, pembengkakan kaki pada bagian paha, anemia dan deformasi tulang ( Iryani, 2003:80).

## **2.2 Asam Benzoat**

Asam benzoat telah banyak dipergunakan sebagai zat anti mikroba di dalam makanan dan terdapat di alam dalam kayu manis, cengkeh, buah prem (prune), dan cranberry. Asam tak terdisosiasi merupakan bentuk yang mempunyai kegiatan anti mikroba, dan memperlihatkan kegiatan optimum pada selang pH 2,5-4,0 karena itu sangat cocok untuk dipergunakan di dalam makanan asam, seperti sari buah, minuman soda, dan asaman. Karena garam natrium asam benzoat lebih mudah larut di dalam air daripada bentuk asamnya, biasanya dipergunakan garam natrium. Di dalam produk sebagian garam diubah menjadi bentuk asam aktif . Asam benzoat sangat aktif terhadap khamir dan bakteri tetapi kurang aktif terhadap jamur. Sering asam benzoat digabungkan dengan asam sorbat atau paraben, dan banyak penggunaannya biasanya dari 0.05 sampai 0.1% bobot.

Asam benzoat tidak menyebabkan dampak yang merusak pada manusia bilamana dipergunakan dalam jumlah kecil. Asam benzoat segera dikeluarkan dari tubuh terutama setelah konyugasi dengan glisina membentuk asam hipurat (Sakidja, 1989: 492-493).

Asam benzoat memiliki struktur kimia seperti Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Asam Benzoat

Asam benzoat memiliki rumus molekul  $C_6H_5COOH$  dan berat molekul 122.22 g/mol. Secara umum, asam benzoat berbentuk jarum atau sisik, putih, sedikit berbau, biasanya berbau benzaldehida atau benzoin. Adapun sifat lainnya sedikit larut dalam air, agak mudah menguap pada suhu hangat, mudah menguap dalam uap air, mudah larut dalam etanol, dalam kloroform dan eter.

### **2.3 Metoda Analisis Kromatografi**

Kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan komponen dalam suatu campuran berdasarkan distribusi komponen antara fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak dapat berupa gas atau cairan dan fasa diam dapat berupa cairan atau padatan.

Kromatografi dapat dibedakan atas berbagai macam, tergantung pada pengelompokkannya. Berdasarkan fase gerak, yang dapat berupa zat cair atau gas, kromatografi dapat digolongkan kromatografi cair (KC) dan kromatografi gas (KG). Berdasarkan fasa diam, yang dapat berupa zat cair atau zat padat, kromatografi dapat digolongkan menjadi kromatografi partisi dan kromatografi jerap (Roy J, 1991).

Berdasarkan pada mekanisme pemisahannya, kromatografi dibedakan menjadi kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi pertukaran ion, kromatografi eksklusi dan kromatografi afinitas. Berdasarkan alat yang digunakan, kromatografi dapat dibagi atas kromatografi kemas, kromatografi lapis tipis, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), dan kromatografi gas ( Arif, 2011).

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

HPLC setidaknya-tidaknya pada saat ini merupakan metoda kromatografi cair yang banyak digunakan. Alat KCKT atau HPLC terdiri atas sistem pencampur pelarut yang mampu menghasilkan campuran landaian yang mengandung empat pelarut yang berbeda, pompa yang mampu menghasilkan tekanan sampai 6000 psi atau 10000 psi, kolom yang mengandung fase diam (atau lebih tepat penyangga), dan sistem pendeteksi sinambung yang bermacam-macam jenisnya. Kolom yang tersedia mempunyai banyak sekali pelat teori (lebih dari 100.000 untuk kolom 100 cm), dan kromatografi dilakukan dalam kondisi yang mendekati kondisi ideal demikian rupa sehingga dapat diperoleh pemisahan yang baik, seringkali hasil dapat diperoleh dalam waktu beberapa menit dan ditafsirkan secara kuantitatif dengan ketepatan yang lumayan.

HPLC mempunyai pembatas yang sebanding dengan kromatografi gas, yaitu cuplikan harus larut di dalam zat cair. Akan tetapi ini bukan pembatas yang berat, dan setidaknya-tidaknya HPLC dapat dipakai untuk sebagian besar senyawa tak atsiri dan senyawa berbobot molekul tinggi. Selain itu, HPLC dapat dipakai untuk senyawa anorganik, yang sebagian besar tidak atsiri. HPLC biasanya dilakukan

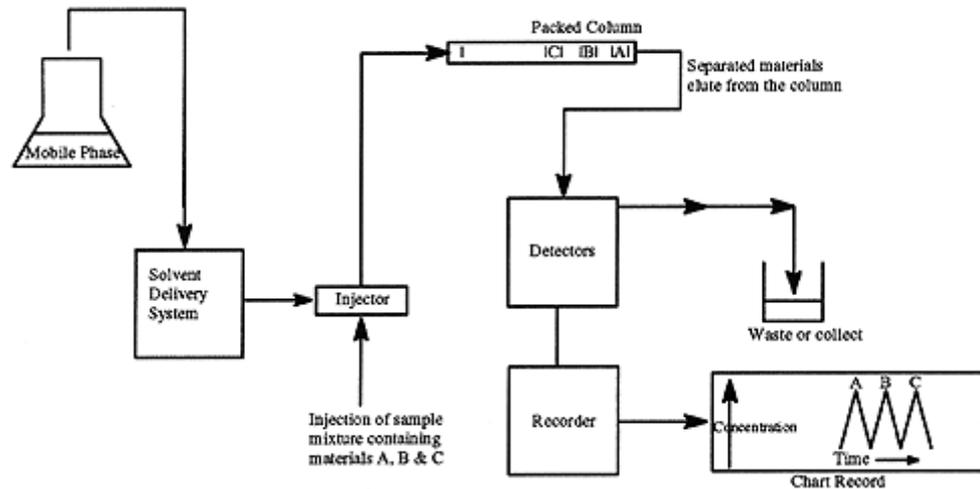
pada suhu kamar. Jadi senyawa yang tidak tahan panas dapat ditangani dengan mudah.

Pada metoda HPLC berdasarkan kepolaran fasa gerak dan fasa diam terdapat sistem kromatografi normal dan kromatografi balik. Dari kedua fase, yaitu fase diam dan fase gerak, salah satu diantaranya selalu harus lebih polar daripada yang lainnya. Misalnya, heksana yang dipakai pada kolom silika kepolarannya jauh lebih rendah daripada permukaan silika. Jika fase yang lebih polar itu fase diam, ini disebut kromatografi normal. Jika fase yang kepolarannya lebih rendah ialah fasa diam, ini dikenal sebagai kromatografi fase balik (Roy J.1991).

## **2.5 Sistem Peralatan HPLC**

Pada HPLC, sampel yang akan dipisahkan diinjeksikan dengan menggunakan injektor yang berada diantara pompa dan kolom. Bersamaan dengan fasa gerak, sampel akan mengalir dari ujung atas kolom melewati kolom, kemudian keluar dari kolom dengan kecepatan berbeda menuju detektor dengan waktu yang berbeda pula.

Skema peralatan HPLC dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Skema peralatan HPLC (www.HPLC.com)

### 2.5.1 Sistem Pompa

Pompa digunakan untuk mendorong fasa gerak melewati kolom. Pada saat pemompaan fasa gerak diperlukan tekanan yang besar. Hal itu disebabkan karena ukuran dari partikel fasa diam yang kecil. Pompa terdiri dari dua jenis yaitu pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran konstan. Pompa terbuat dari bahan yang inert terhadap semua pelarut.

Sistem pompa merupakan komponen yang penting untuk menentukan hasil resolusi, kecepatan analisis dan reproduksibilitas analisis. Pompa yang baik harus memiliki pengaliran yang stabil tanpa getaran untuk meminimalkan gangguan pada detektor, tahan terhadap semua jenis pelarut dan volume pengaliran untuk analisis harus konstan dengan kecepatan pengaliran 0.5-10 ml/menit.

### 2.5.2 Sistem Detektor

Ada beberapa jenis detektor yang digunakan, dengan pemilihan yang umumnya didasarkan pada persyaratan sensitivitas, jenis senyawa yang ada didalam sampel, dan faktor-faktor lain seperti biaya. Detektor yang paling umum didasarkan pada indeks bias dari eluat kolom, karena hampir semua zat terlarut akan menghasilkan larutan dengan indeks bias yang berbeda dengan indeks bias pelarut murni. Detektor ini mampu menginderaai perbedaan tersebut dengan menghasilkan sinyal listrik yang proporsional yang kemudian diperkuat dan direkam untuk menghasilkan kromatogram ( Day dan Underwood, 1998:558).

Detektor pada HPLC dikelompokkan menjadi dua yaitu detektor universal dan detektor spesifik. Detektor universal mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik dan tidak bersifat selektif seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa. Sedangkan detektor spesifik hanya mendeteksi analit secara spesifik dan selektif seperti detektor UV-Vis dan detektor fluoresensi.

Detektor yang umum digunakan adalah detektor UV. Detektor UV dioperasikan untuk pendeteksian analit yang mempunyai serapan pada panjang gelombang UV. Fasa gerak tidak boleh mempunyai panjang gelombang serapan UV agar diperoleh *baseline* yang stabil (Johnson, 1991).

### 2.5.3 Injektor

Kerja kolom yang baik berhubungan langsung dengan persiapan injeksi sampel ke dalam kolom. Injektor merupakan tempat memasukkan sampel atau cuplikan yang akan dianalisa ke dalam alat kromatografi. Untuk mendapatkan

pemisahan yang sempurna, selain kolom yang baik juga ditentukan oleh banyaknya cuplikan yang dimasukkan ke dalam sistem injektor.

Injektor terbagi menjadi tiga tipe yaitu injektor dengan cara menghentikan aliran (stop flow), septum dan katup putaran. Injektor yang sering digunakan adalah adalah injector katup putaran dimana tipe injektor ini digunakan untuk menginjeksi volume lebih besar dari 10 $\mu$ L. Jika katup pada posisi load, maka sampel dalam putaran. Bila katup difungsikan, maka sampel akan bergerak ke kolom.

#### 2.5.4 Fasa Gerak

Pada metoda HPLC terdapat berbagai macam jenis fasa gerak. Ada beberapa sifat yang harus dipenuhi oleh fasa gerak yaitu murni dan tidak terdapat kontaminan, tidak bereaksi dengan wadah, sesuai dengan detektor, dapat melarutkan sampel, mempunyai viskositas rendah dan memungkinkan perolehan kembali sampel dengan mudah (Johnson, 1991).

Umumnya fasa gerak yang sudah digunakan langsung dibuang karena prosedur pemurniannya kembali sangat sulit dan mahal biayanya. Menghilangkan gelembung udara dari fasa gerak sangat diperlukan pada HPLC. Udara terlarut yang tidak dikeluarkan akan menyebabkan gangguan besar di dalam detektor sehingga data yang diperoleh tidak dapat digunakan.

### 2.5.5 Fasa Diam

Kolom merupakan jantung kromatografi yaitu sebagai tempat terjadinya proses pemisahan. Kolom merupakan bagian yang sangat penting karena menjadi kunci penentu keberhasilan pemisahan komponen-komponen sampel serta hasil akhir analisis dengan HPLC.

Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu kolom analitik dan kolom preparatif. Kolom analitik panjang kolomnya tergantung pada jenis material pengisi kolom dan memiliki diameter 2-6 mm. Untuk kemasan poros mikropartikel, panjang yang digunakan adalah 10-30 cm, saat ini ada yang menggunakan 5 cm. Untuk kemasan pelikular panjang yang digunakan adalah 50-100 cm. Sedangkan kolom preparatif memiliki diameter 6 mm dan panjang kolom 25-100 cm.

Kolom umumnya terbuat dari stainless steel dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar, tetapi bisa juga digunakan temperatur yang lebih tinggi, terutama untuk kromatografi penukar ion dan kromatografi eklusi. Pengepakan kolom tergantung pada model HPLC yang digunakan ( Effendi.2004).

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan:

1. Kondisi optimum pada penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat pada minuman ringan secara HPLC yaitu menggunakan kolom ODS C<sub>18</sub>, laju alir 1 ml/mnt pada panjang gelombang 240 nm, secara elusi gradien pada komposisi fasa gerak metanol:buffer asetat 5:95 dan akan konstan pada komposisi 50:50 pada waktu 5 menit dengan pH buffer asetat 3.5, dengan waktu retensi asam askorbat adalah 3.73 menit dan 11.07 menit untuk asam benzoat.
2. Pada sampel minuman ringan yang dijual bebas dilingkungan sekolah tidak ditemukan asam askorbat dan asam benzoat sebagai pengawet, sedangkan pada sampel minuman ringan yang dijual bebas dipasaran, asam benzoat ditemukan dalam empat sampel yaitu sampel B, C, D, dan E, dimana kadar tertinggi diperoleh pada sampel C yaitu 676 ppm yang melebihi batas maksimum yang diizinkan dalam pemakaian asam benzoat sebagai pengawet, dimana kadar yang diizinkan menurut SNI 01-0222-1995 untuk asam benzoat 600 ppm. Untuk asam askorbat ditemukan pada sampel A, C dan D. Dimana kadar tertinggi terdapat pada sampel A yaitu 2869 ppm.

## **5.2 Saran**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan untuk:

1. Menggunakan fasa gerak yang lebih semipolar pada penelitian asam askorbat agar diperoleh waktu retensi yang lebih lama.
2. Disarankan untuk melakukan penentuan jenis pengawet lainnya, serta menggunakan bahan baku pembanding dalam bentuk garam.

## DAFTAR PUSTAKA

- Iryani. 2003. *Kimia Pangan*. Padang: FMIPA UNP.
- Adnan Moehammad.1997. *Teknik Kromatografi Untuk Analisis bahan makanan*. Yogyakarta: Andi.
- Aman Sentosa Panggabean dkk, 2011. *Optimasi Kinerja Analitik Pada Penentuan Kafein dengan Metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Samarinda: Kimia FMIPA Unmul.
- Hayun, Yahdiana, & Citra, 2004. *Penetapan Kadar Sakarin, Asam Benzoat, Asam Sorbat, Kofeina, dan Aspartam di Dalam Minuman Ringan Bersoda Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Jakarta: Farmasi FMIPA UI.
- Johnson dan Stevenson, 1991. *Dasar Kromatografi Cair*, Terjemahan K.Padmawinata. Bandung: ITB.
- Laila Fitriana dan Sito Resmi, 2009. *Analisis Kandungan Bahan Pengawet Dalam Produk Minuman Kemasan Yang Ada di Pasaran Untuk Menjaga Keamanan Pangan Masyarakat*. Semarang: Fakultas Teknik UnDip
- Novelina dkk, 2009. *Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Senyawa Siklamat Dalam Minuman Ringan*. Jakarta: Prosiding PPI Standardisasi.
- Nurhamidah, 2005. *Penentuan Kondisi Optimum Untuk Pemisahan Residu Pestisida Imidakloprid, Profenofos dan Deltametrin Pada Cabai*. Bengkulu:FKIP Universitas Bengkulu.
- Putra Effendy, 2004. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi* :Fmipa USU.
- R.A Day dan A.L Underwood.A.L, 1998. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga.
- Roy J. Gritter dkk, 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung: ITB.
- Sakidja M.S, 1989. *Kimia Pangan*.Jakarta : Departemen Pendidikan dan Kebudayaan.
- Sunita Almatsier. 2004. *Prinsip dasar ilmu gizi*: Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Tarmizi, 2008. *Pembuatan Pereaksi Kimia*. Padang: UNP Press.
- Yandra Arief,2011. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dengan Fasa Gerak Metanol dan Buffer Fosfat Untuk Penentuan Asam Benzoat,Natrium Sakarin dan Kafein*. Padang: Universitas Andalas.