



**STUDI EFEK TEMPERATUR PADA ANALISA VITAMIN C
DALAM SARI BUAH JERUK MANIS (*citrus sinensis, sp*)
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI**

SKRIPSI

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan Program Sarjana Jurusan
Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

Aspek	Hadiah	Klass
Terima	Pembelian	633.62
Tgl 13 JUL 2007		Ror
No. Induk :		5
Oleh	KLASIR / PENYALIN :	1

Syahrina Umi Rosandy
021810301101

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2007**

PERSEMBAHAN

Bismillahirrohmanirrohim.....

Dengan menyebut nama Allah SWT, yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, atas berkat rahmat dan hidayahnya sehingga dapat kuselesaikan karya kecil yang merupakan bagian dari cita-cita hidupku.

Dengan segala ketulusan dan kerendahan hati, kupersembahkan karya kecil ini untuk orang-orang yang kukasihi :

- Ayahanda H. Sumardi dan Ibunda Hj. Parmi, S.Pd, yang tak henti-hentinya mengalirkan untaian do'a tiap langkahku, kerja keras, biaya, kasih sayang dan perhatiannya yang selalu menguatkan aku, semoga aku senantiasa membahagiakan kalian, aku sayang kalian.
- Kakakku Nuraini Windi Astuti, AMD, dan Mas Wiwid, Adekku Ardiansyah Rochmad Afdillah, terima kasih atas dorongan dan masukannya. Ponakanku Muhammad Alief Nurwidyanto, ocehanmu buat tante semangat lagi.
- Dedy Sarjono, S.Si, terima kasih atas hari kemarin, hari ini dan hari esok, semoga kebahagiaan selalu milik kita. Terima kasih juga atas kehadiranmu di ujung keputusasaanmu, kesetiaan, kasih sayang, pengorbanan, nasehat dan motivasinya.
- All my friend 2002, terima kasih atas kebersamaan kita, semoga sukses semua, okey.....
- Komunitas Jawa VI / 30, semua keceriaan kita tidak akan terlupakan.
- Buat ALMAMATER yang kucintai.

MOTTO

Barang siapa yang menempuh suatu jalan untuk mencari ilmu pengetahuan,
pasti Allah memudahkan jalannya ke Surga
(HR. Imam Muslim dan Abu Hurairah)

Engkau tidak akan menjadi orang-orang yang bertaqwa hingga engkau
berilmu, dan engkau tidak akan menjadi orang yang baik sehingga engkau
mengamalkan ilmunu.
(Abu Darda')

Dimana ada sinar mentari disana ada kehidupan, dimana ada harapan
disanalah suatu kebahagiaan bakal ditemukan.
(Rhiena)

Menjadi penting itu memang baik tetapi bersikap baik itu selalu penting
(My Mom)

Jangan jadi pohon yang menancap jika bisa jadi air yang mengalir. Jangan
menjadi air jika bisa menjadi batu karang yang memecah arus.
(Anonymous)

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Syahrina Umi Rosandy

NIM : 021810301101

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul "*Studi Efek Temperatur Pada Analisa vitamin C Dalam Sari Buah Jeruk Manis (citrus sinensis, sp) Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*" adalah benar-benar karya sendiri, kecuali jika disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun. Serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juni 2007

Yang menyatakan



Syahrina Umi Rosandy

021810301101

SKRIPSI

**STUDI EFEK TEMPERATUR PADA ANALISA VITAMIN C
DALAM SARI BUAH JERUK MANIS (*citrus sinensis, sp*)
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI
CAIR KINERJA TINGGI**

Oleh :
Syahrina Umi Rosandy
021810301101

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Drs. Zulfikar, PhD
Dosen Pembimbing Akademik : Drs. Busroni, MSi

PENGESAHAN

Skripsi berjudul Studi Efek Temperatur Pada Analisa Vitamin C Dalam Sari Buah Jeruk Manis (citrus sinensis, sp) Menggunakan KCKT telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember :

Hari : **SELASA**
Tanggal : **03 JUL 2007**
Tempat : Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua



Drs. Zulfikar, PhD
NIP. 131 660 785

Sekretaris



Drs. Busroni, MSi
NIP. 131 945 865

Anggota I



Drs. Achmad Sjaifullah, MSc, PhD
NIP. 131 592 358

Anggota II



Anak Agung Istri Ratnadewi, Ssi, Msi
NIP. 132 162 523

Mengetahui

Dekan Fakultas dan Ilmu Pendidikan

Universitas Jember




Ir. Sumadi, MS
NIP. 130 368 784

RINGKASAN

Study Efek Temperatur Pada Analisa Vitamin C di Dalam Sari Buah Jeruk Manis (*citrus sinensis, sp*) Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Syahrina Umi Rosandy, 021810301101, 2007 : 62 halaman, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Vitamin merupakan salah satu senyawa yang diperlukan oleh makhluk hidup selain karbohidrat, lemak, protein, garam dan air sebagai faktor aksesori (faktor pelengkap) (Hopkins, 1906-1912). Vitamin merupakan senyawa-senyawa organik yang dibutuhkan makhluk hidup untuk pertumbuhan dan mempertahankan hidup, dibutuhkan dalam jumlah kecil dan bekerja secara efektif. (Andarwulan, 1989). Banyak yang menggunakan analisis vitamin C dengan *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi* (KCKT) atau orang mengenalnya dengan sebutan *HPLC* karena daya ulangnya lebih baik, koefisien distribusinya konstan dalam jangka konsentrasi yang agak luas sehingga dapat menghasilkan puncak yang simetris dan lebih tajam (Adnan, 1997).

Permasalahan yang akan dipelajari dalam penelitian ini adalah Bagaimana separasi vitamin C dari buah jeruk manis (*citrus sinensis, sp*), bagaimana pengaruh suhu terhadap kandungan vitamin C di dalam sari buah jeruk manis, bagaimana kondisi optimum pengukuran vitamin C di dalam sari buah jeruk manis. Batasan masalah dari penelitian ini adalah sampel yang digunakan adalah buah jeruk manis (*citrus sinensis,sp*), digunakan suhu kamar, 35°C dan 50°C untuk menganalisa degradasi vitamin C dalam buah jeruk, separasi dan analisa menggunakan KCKT dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm. Manfaat dari penelitian ini adalah memperkenalkan teknik analisis vitamin C di dalam sari buah jeruk manis, sebagai teknik pengembangan KCKT untuk analisis vitamin C dengan praktis, cepat dan mudah, memberi informasi tentang pengaruh suhu pada sari buah jeruk akibat pemanasan.

Dengan menggunakan seperangkat alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, dengan pompa jenis double piston. Kolom jenis C-18 water dan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm. Dengan menggunakan kondisi kromatogram tersebut, diperoleh informasi-informasi bahwa . Kondisi optimum untuk mengetahui degradasi vitamin C di dalam buah jeruk manis jenis navel adalah dengan menggunakan kecepatan alir 1,0 ml/min, pH 5 dan eluen 10 %. Separasi vitamin C dalam sari buah jeruk manis jenis navel dengan Ekstraksi menggunakan klorofom menyebabkan komponen non polar dari sari buah jeruk manis dapat larut dalam klorofom. Proses degradasi vitamin C terjadi lebih cepat dengan bertambahnya temperatur sehingga sari buah jeruk manis mengalami penurunan kandungan vitamin C. Di dalam 197,1 gram buah jeruk manis jenis navel terdapat 60,72 % vitamin C.

PRAKATA

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga skripsi yang berjudul : "*Studi Efek Temperatur Pada Analisa vitamin c di Dalam Sari Buah Jeruk Manis (citrus sinensis, sp) Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*", dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Pendidikan Sarjana Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Pada kesempatan ini disampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

1. Rektor Universitas Jember;
2. Bapak Ir. Sumadi, MS, selaku Dekan Fakultas MIPA Universitas Jember;
3. Bapak Drs. Siswoyo, MSc, PhD, selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Jember;
4. Bapak Drs. Zulfikar, PhD, selaku Dosen Pembimbing I dan Bapak drs. Busroni, Msi, selaku Dosen Pembimbing II dalam penyusunan skripsi ini;
5. Bapak Drs. A. Sjaifullah, MSc, PhD, selaku dosen penguji I dan Ibu AA. Istri Ratnadewi, Ssi, Msi, selaku dosen penguji II.
6. Dosen-Dosen Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Jember;
7. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini.

Semoga bantuan, bimbingan dan dorongan beliau dicatat sebagai amal baik oleh Allah SWT dan mendapat balasan yang setimpal dari-Nya. Amin. Akhirnya semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Jember, Juni 2007

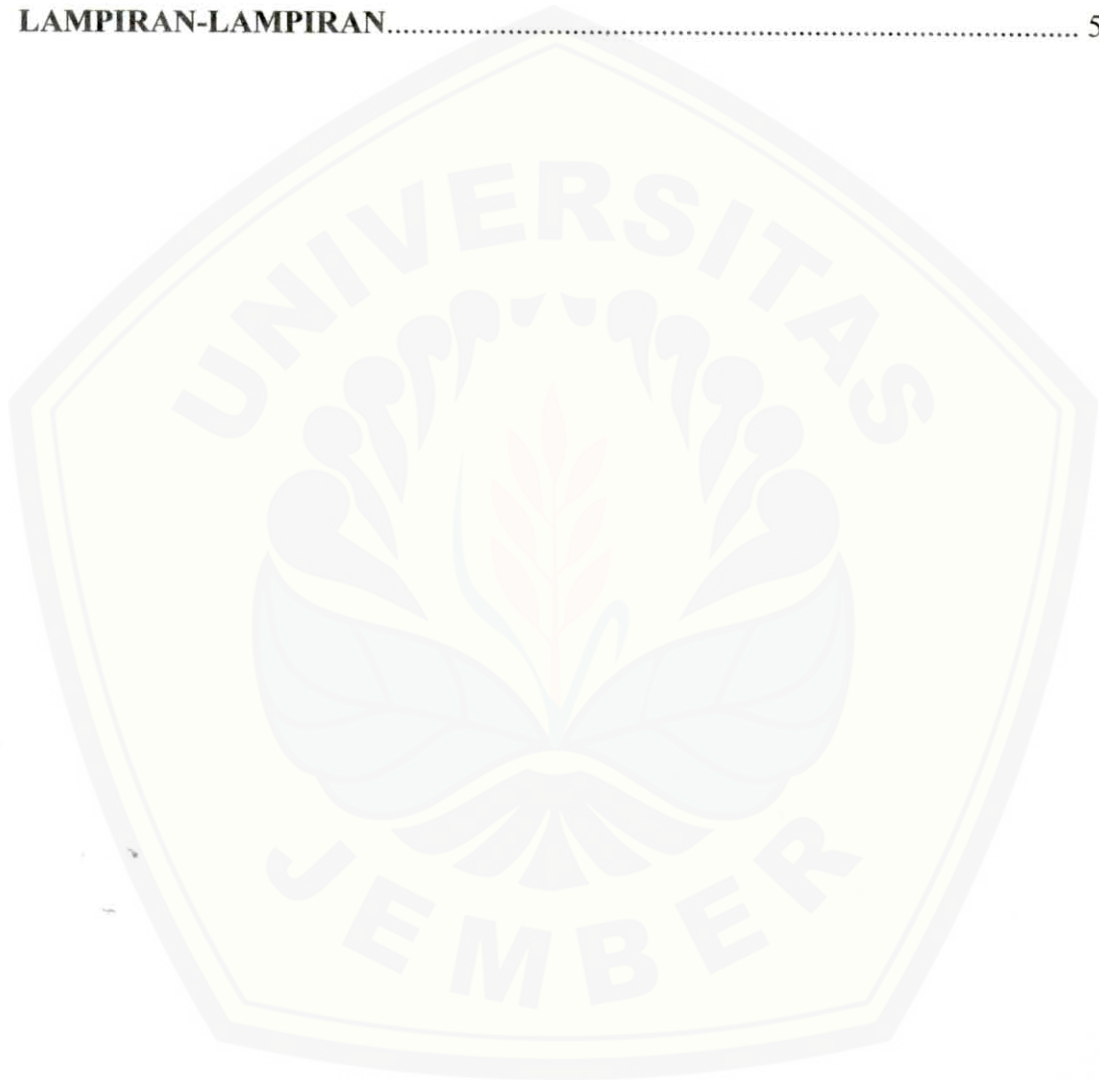
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PERNYATAAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	vii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan masalah	4
1.4 Tujuan	4
1.5 Manfaat	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Vitamin C	6
2.1.1 Struktur.....	6
2.1.2 Sifat	6
2.1.3 Stabilitas.....	7
2.1.4 Manfaat	8
2.2 Kromatografi Cair Kinerja tinggi.....	11
2.2.1 Prinsip Dasar	11

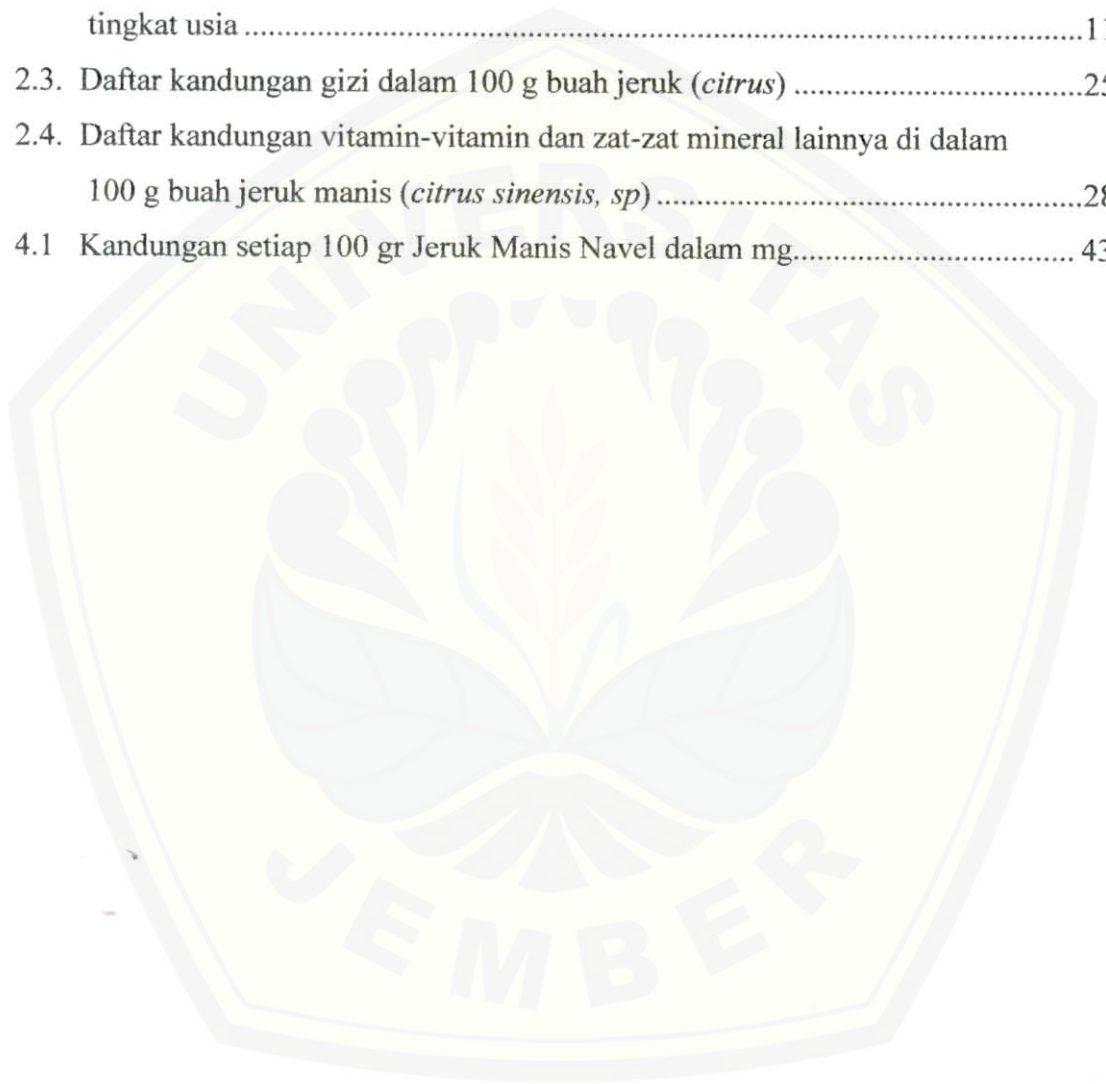
2.2.2 Instrumentasi	14
2.3 Retensi.....	20
2.4 Efisiensi Kolom.....	21
2.5 Selektivitas dan Resolusi.....	21
2.6 Kromatografi Fase Terbalik	22
2.7 Jeruk (<i>citrus</i>)	23
2.7.1 Kandungan dan Khasiat Buah Jeruk (<i>citrus</i>)	24
2.7.2 Jeruk Manis (<i>citrus sinensis, sp</i>).....	27
BAB 3. METODOLOGI	30
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	30
3.2 Alat dan Bahan.....	30
3.2.1 Alat.....	30
3.2.2 Bahan	30
3.3 Diagram Alir	31
3.3.1 Preparasi Sampel.....	31
3.3.2 Preparasi Standar.....	32
3.4 Prosedur Kerja.....	33
3.4.1 Penyiapan Bahan.....	33
3.4.2 Kondisi Kromatogram.....	34
3.5 Optimasi Parameter.....	34
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Kecepatan Alir (Flow Rate) Eluen Optimum.....	36
4.2 Larutan Buffer Eluen Optimum	38
4.3 Komposisi Eluen (meyanol + buffer) Optimum	39
4.4 Kalibrasi	42
4.5 Analisis Sampel.....	42
4.5.1 Preparasi.....	42
4.5.2 Hasil Analisis Dengan KCKT.....	45
4.5.2 Trend Suhu Sampel.....	46

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1 Kesimpulan	48
5.2 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN-LAMPIRAN	51



DAFTAR TABEL

2.1. Kandungan vitamin C di dalam buah-buahan.....	10
2.2. Kebutuhan vitamin C pada perempuan dan laki-laki dengan berbagai tingkat usia	11
2.3. Daftar kandungan gizi dalam 100 g buah jeruk (<i>citrus</i>)	25
2.4. Daftar kandungan vitamin-vitamin dan zat-zat mineral lainnya di dalam 100 g buah jeruk manis (<i>citrus sinensis, sp</i>)	28
4.1 Kandungan setiap 100 gr Jeruk Manis Navel dalam mg.....	43



DAFTAR GAMBAR

2.1. Struktur asam askorbat.....	6
2.2. Struktur asam askorbat rantai terbuka.....	8
2.3. Satu set seperangkat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	14
2.4. Kolom kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	18
4.1 Grafik optimasi Flow Rate (kecepatan alir).....	38
4.2 Sinyal dengan adanya ekor.....	37
4.3 Sinyal dengan bahu.....	38
4.4. Grafik optimasi pH.....	39
4.5 struktur C-18.....	40
4.6 Struktur fase diam nonpolar (reversed phase).....	40
4.7. Grafik optimasi eluen.....	41
4.8 Grafik Kalibrasi Vitamin C.....	42
4.9 Sinyal vitamin C pada beberapa variasi suhu.....	45
4.10 Grafik Sampel.....	46

DAFTAR LAMPIRAN

A. Optimasi Flow Rate.....	51
B. Optimasi Buffer.....	52
C. Optimasi Eluen.....	53
D. Kalibrasi Standart Asam Askorbat.....	54
E. Pengukuran Sampel.....	54
F. Grafik Optimasi Flow Rate.....	55
G. Grafik Optimasi Buffer.....	55
H. Grafik Optimasi Eluen.....	56
I. Grafik Kalibrasi Standar Asam Askorbat.....	56
J. Grafik Pengukuran sampel.....	57
K. Perhitungan Kandungan Vitamin C dalam Jeruk Navel.....	58
L. Alat Penelitian.....	59
M. Bahan Penelitian.....	61



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Vitamin merupakan salah satu senyawa yang diperlukan oleh makhluk hidup selain karbohidrat, lemak, protein, garam dan air sebagai faktor aksesori (faktor pelengkap) (Hopkins, 1906-1912). Vitamin tidak menghasilkan energi, dapat dibedakan dari komponen pangan sebagai sumber energi seperti karbohidrat, protein, dan lemak. Vitamin merupakan senyawa-senyawa organik yang dibutuhkan makhluk hidup untuk pertumbuhan dan mempertahankan hidup, dibutuhkan dalam jumlah kecil dan bekerja secara efektif. Kelebihan vitamin akan diekskresikan/dikeluarkan tanpa mengalami perubahan. Senyawa ini tidak digunakan sebagai unit pembangun struktur tubuh organisme dan sel-selnya, tetapi sangat penting untuk transformasi energi dan pengaturan metabolisme tubuh (Andarwulan, 1989). Dalam reaksi biokimia, vitamin bersama-sama dengan hormon dan enzim berfungsi sebagai katalis karena termasuk dalam senyawa biokatalis.

Secara umum vitamin dibedakan menjadi dua yaitu vitamin yang larut dalam air dan vitamin yang larut dalam lemak. Artinya, vitamin yang larut dalam air didasarkan pada perbedaan sifat kimia dan sifat fisiologisnya. Sedangkan vitamin yang larut dalam lemak hanya didasarkan pada perbedaan sifat kimiawi (Andarwulan, 1989).

Salah satu vitamin yang banyak dibutuhkan dalam tubuh adalah vitamin C. Vitamin C ini adalah kelompok vitamin yang larut dalam air karena merupakan senyawa yang sangat mudah larut dalam air, mempunyai sifat asam dan sifat pereduksi yang kuat. Bentuk vitamin C yang ada di alam terutama adalah L-asam askorbat.

Vitamin C merupakan bagian aktif di dalam sel dan hidroksilat pada asam amino prolin dan lisin. Peranan vitamin C dalam hal ini adalah membantu pembentukan molekul prekursor atau disebut prokolagen yang akan diubah kedalam kolagen di luar sel. Dari bagian aktif tersebut, vitamin C mempunyai sifat reduktor kuat dan mempunyai sifat asam. Vitamin C adalah turunan karbohidarat dan merupakan antioksidant yang sangat bagus karena memberikan satu atom hidrogen dan membentuk radikal bebas ascorbyl yang relatif stabil (Weber, 1996). Vitamin C didalam tubuh dapat ditemukan didalam leukosit yaitu sel darah putih yang merupakan komponen sangat penting di dalam sistem kekebalan tubuh. Selain itu juga dapat ditemukan di dalam lymphocytes yaitu salah satu jenis leukosit dan berfungsi sebagai bagian penting untuk respon kekebalan pada penderita kanker dan hanya berfungsi efektif jika konsentrasi vitamin C tinggi.

Defisiensi atau kekurangan vitamin C akan menyebabkan gangguan kesehatan. Gejala akan muncul ketika jumlah serum turun di bawah 0,2 mg / dl. Kebutuhan vitamin C yang diperlukan oleh tubuh setiap hari adalah sekitar 10-20 mg. Apabila kurang dari dosis tersebut dapat menimbulkan gangguan kesehatan.

Kekurangan vitamin C sering terjadi dan bermanifestasi setelah beberapa bulan, yaitu sebagai penyakit skorbut, kerusakan jaringan ikat, perdarahan dan gigi tanggal (Jon Koolman, 1995). Gejala lain yang ditunjukkan akibat defisiensi vitamin C yang biasa dikenal adalah sariawan, gusi bengkak dan meradang, mulut dan mata kering, rambut rontok dan kulit menjadi kering dan gatal. Hal tersebut tidak akan terjadi jika kolagen dan pembuluh darah mengandung vitamin C yang cukup.

Vitamin C stabil dalam bentuk kristal tetapi mudah rusak atau terdegradasi jika berada dalam bentuk larutan, terutama jika terdapat udara, logam-logam dan cahaya. Vitamin C bersifat sangat sensitif terhadap pengaruh-pengaruh luar yang menyebabkan kerusakan seperti suhu, pH, oksigen dan enzim. Adanya oksigen akan menyebabkan asam askorbat terdegradasi terutama melalui mono-anionnya menjadi asam dehidroaskorbat dan hidrogen peroksida, di mana hidrogen peroksida dapat menyebabkan terjadinya autooksidasi (Andarwulan, 1989).

Vitamin C banyak terdapat di alam, terutama di dalam buah segar dan sayuran. Misalnya saja pada jeruk, cabe hijau, bayam, daun rempah-rempahan dan bahkan termasuk bawang merah (Thomas, 1992). Sumber vitamin C juga dapat berasal dari hewan seperti daging, ikan, ayam potong, telur dan berbagai produk susu. Akan tetapi vitamin C tersebut mudah sekali terhidrolisis bila dimasak karena vitamin C tidak tahan oleh suhu tinggi. Selain sumber-sumber vitamin C di atas, asupan vitamin C juga dapat diperoleh dari obat-obatan yang khusus dikemas untuk memenuhi kebutuhan vitamin sehari-hari.

Metode analisis vitamin C dalam bahan pangan dapat dikelompokkan menjadi metode fisik, metode kimia, metode biokimia dan metode biologis. Namun diantara metode tersebut, metode kimia merupakan cara pengukuran vitamin C yang banyak macamnya dan paling sering digunakan. Dalam penentuan kandungan vitamin C pada suatu bahan, sejumlah vitamin C yang terikat dengan komponen protein dan bersifat non pereduksi harus dibebaskan terlebih dahulu (Andarwulan, 1989).

Berbagai teknik analisa telah dikembangkan dan dipublikasikan untuk mendeteksi asam askorbat. Yang sering digunakan adalah spektrofotometri, titrasi iodimetri dan 2,6-dikloroindifenol. Metode penentuan asam askorbat yang lain yaitu dengan titrasi amperometri dan potensiometri. Tetapi beberapa diantara metode ini mempunyai sensitivitas yang rendah. Oleh karena itu, keakuratan, kecepatan dan metode yang sederhana untuk penentuan asam askorbat diperlukan (Shen *et al.*, 2001).

Analisis vitamin C yang lain adalah menggunakan *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi* (KCKT) atau orang mengenalnya dengan sebutan *HPLC*. Beberapa penelitian yang menggunakan HPLC antara lain : analisis kandungan vitamin C di dalam plasma darah (Bin Zhao *et al.*, 2004), analisis kandungan bahan pengawet dalam jus jeruk (Hyoung *et al.*, 1986), analisis asam organik dan kadar gula dalam jus tomat (Cristina, 1986). Namun analisa vitamin C dalam sampel sari buah jeruk manis dengan menggunakan pengaruh temperatur belum banyak dilakukan sehingga

penelitian ini difokuskan untuk mempelajari pengaruh temperatur pada analisa vitamin C di dalam sari buah jeruk manis.

Kelebihan KCKT dibanding metode yang lain adalah daya ulangnya lebih baik, koefisien distribusinya konstan dalam jangka konsentrasi yang agak luas sehingga dapat menghasilkan puncak yang simetris dan lebih tajam (Adnan, 1997).

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang akan dipelajari dalam penelitian ini adalah :

1. Bagaimana separasi vitamin C dari buah jeruk manis (*citrus sinensis, sp*).
2. Bagaimana pengaruh suhu terhadap kandungan vitamin C di dalam sari buah jeruk manis.
3. Bagaimana kondisi optimum pengukuran vitamin C di dalam sari buah jeruk manis.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Sampel yang digunakan adalah buah jeruk manis (*citrus sinensis, sp*).
2. Digunakan suhu kamar, 35°C dan 50°C untuk menganalisa degradasi vitamin C dalam buah jeruk.
3. Separasi dan analisa menggunakan KCKT dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm

1.4 Tujuan

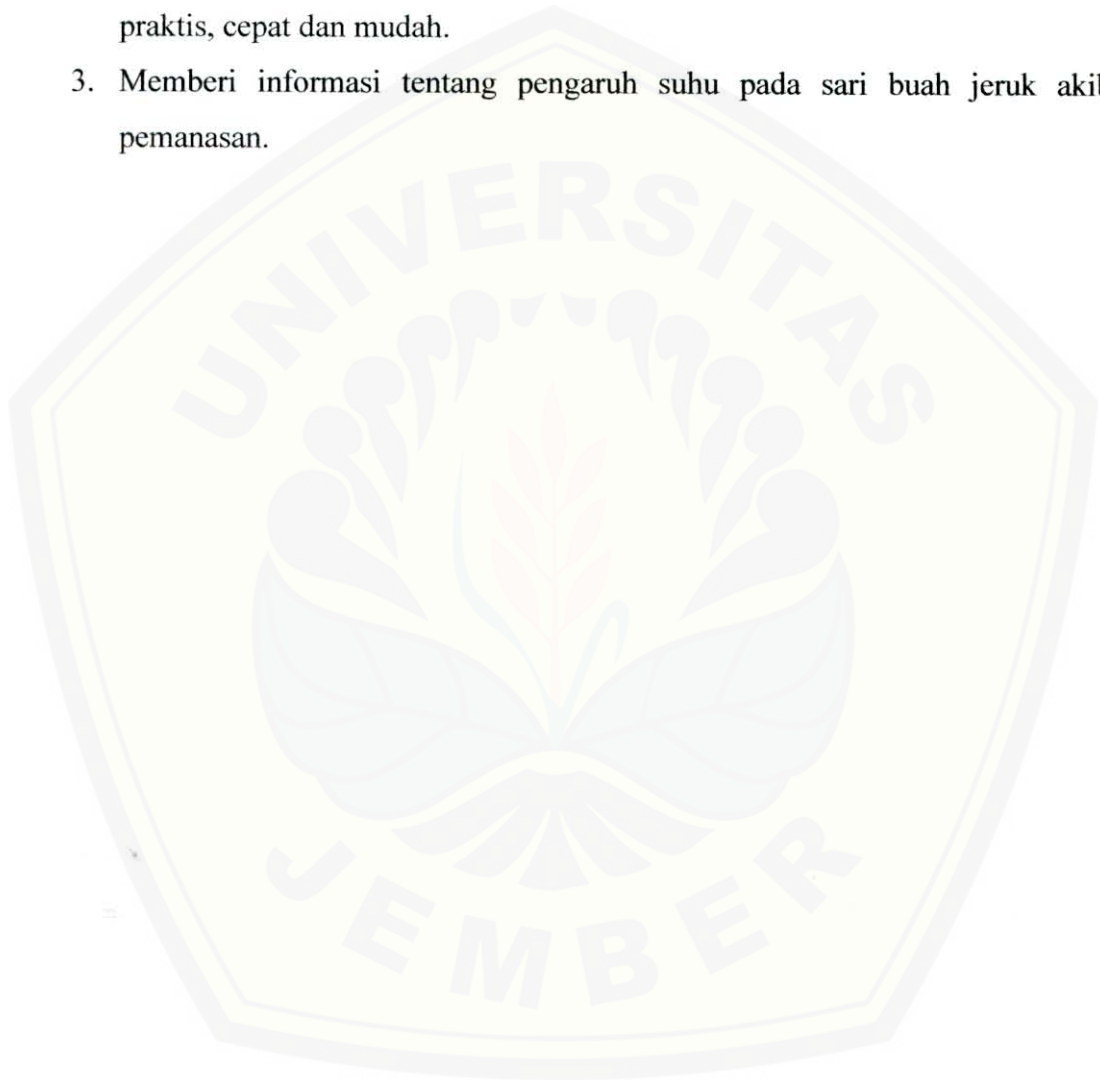
Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui separasi vitamin C dari buah jeruk manis (*citrus sinensis, sp*).
2. Mengetahui pengaruh suhu terhadap kandungan vitamin C di dalam sari buah jeruk manis.
3. Mengetahui kondisi optimum pengukuran vitamin C di dalam sari buah jeruk manis.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Memperkenalkan teknik analisis vitamin C di dalam sari buah jeruk manis.
2. Sebagai teknik pengembangan KCKT untuk analisis vitamin C dengan praktis, cepat dan mudah.
3. Memberi informasi tentang pengaruh suhu pada sari buah jeruk akibat pemanasan.





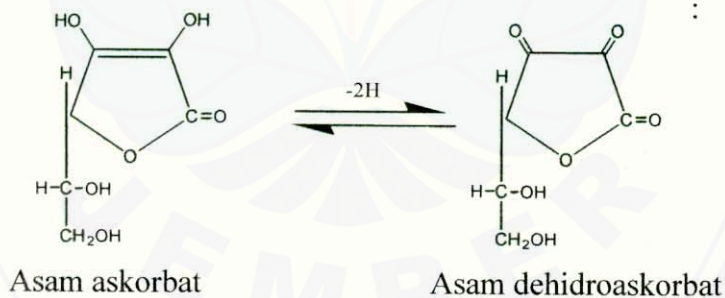
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Vitamin C

2.1.1 Struktur

Vitamin C atau lebih dikenal dengan L-asam askorbat mempunyai rumus empiris $C_6H_8O_6$ dan berat molekul 176,12. Berdasarkan sifat-sifat dan struktur kimianya, vitamin C digolongkan atau diklasifikasikan ke dalam kelompok senyawa yang disebut reduktan. Semua senyawa yang termasuk golongan reduktan berada dalam sistem oksidasi – reduksi (redoks) yang bersifat reversibel.

Struktur vitamin C pertama kali diusulkan oleh Howart dan Hirst pada tahun 1933, dimana mereka mengganti vitamin C sebagai askorbat untuk memasukkannya ke dalam bagian antiscorbutic. Satu tahun kemudian Reichstein dan Grussner mengusulkan satu metode untuk mensintesis vitamin C dan digunakan sampai sekarang (Cristope, 2004).



Gambar 2.1. Struktur asam askorbat

Asam askorbat merupakan zat pereduksi yang kuat dengan potensial reduksi standar $E^{\circ} = 0.077$ (Rieger, 1994)

2.1.2 Sifat

Vitamin C merupakan suatu senyawa yang sangat mudah larut dalam air, sedikit larut dalam alkohol dan tidak larut dalam benzene, eter, khlorofom, minyak dan sejenisnya. Sifat yang paling utama dari vitamin C adalah kemampuan

mereduksinya yang kuat dan mudah teroksidasi yang dikatalis oleh beberapa logam, terutama Cu dan Ag (Weber, 1996).

Vitamin C mempunyai dua jenis ion positif dengan nilai pKa yang berbeda. Di dalam larutan, gugus hidroksil asam askorbat sangat mudah terionisasi dengan $pK_1 = 4,04$ pada 25°C dan memberikan nilai pH 2,5. sedangkan gugus hidroksil yang lain lebih tahan terhadap ionisasi dan mempunyai nilai $pK_2 = 11,4$. Asam askorbat mudah sekali mengalami oksidasi menjadi asam dehidroaskorbat dan membentuk sistem redoks dengan asam askorbat. Oksidasi dehidro asam askorbat menghasilkan asam 2,3-deketogulonat yang bersifat irreversibel dan tidak mempunyai aktivitas vitamin C sama sekali (Andarwulan, 1989).

Vitamin C merupakan vitamin yang paling mudah rusak. Disamping sangat larut dalam air, vitamin C mudah teroksidasi dan proses tersebut dipercepat oleh panas, sinar, alkali, enzim, oksidator, serta oleh katalis tembaga dan besi (Winarno, 2002). Vitamin C mudah mereduksi kation-kation logam dengan menetralkan logam-logam tersebut.

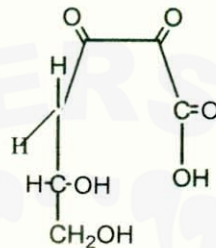
2.1.3 Stabilitas

Vitamin C termasuk salah satu jenis vitamin yang kurang stabil dan mudah hilang selama proses pengolahan dan penyimpanan. Selain itu juga sangat labil dan mudah hilang bila terkena temperatur yang tinggi. Kemampuan vitamin C yang sangat larut dalam air mengakibatkannya sangat mudah hilang akibat luka permukaan atau pada waktu pemotongan bahan pangan.

Vitamin C menjadi sangat tidak stabil di dalam air yang mengandung logam dan oksigen. Adanya oksigen akan menyebabkan vitamin C terdegradasi menjadi asam dehidroaskorbat dan hidrogen peroksida, di mana hidrogen peroksida dapat menyebabkan terjadinya autooksidasi. Dengan adanya logam dapat menyebabkan kerusakan vitamin C yang cukup berarti dalam bahan pangan meskipun logam tersebut berada dalam konsentrasi yang sangat rendah sekalipun. Logam-logam yang sangat berpengaruh adalah Cu^{2+} dan Fe^{3+} (Andarwulan, 1989). Pengaruh aktivitas air terhadap stabilitas vitamin C juga telah mendapat perhatian para ahli. Beberapa ahli

telah membuktikan bahwa kecepatan kerusakan vitamin C dalam bahan pangan akan meningkat dengan meningkatnya aktivitas air, walaupun pengaruh aktivasi tidak tetap.

Vitamin C lebih stabil pada kondisi asam karena terbentuk siklik lakton. Apabila dalam kondisi basa akan terbentuk asam askorbat rantai terbuka. Berikut struktur rantai terbuka asam askorbat :



Gambar 2.2. Struktur asam askorbat rantai terbuka

Vitamin C relatif stabil pada sari buah jeruk yang ber-pH rendah dengan kandungan sitrat tinggi. Tetapi karena *dehidroaskorbat* (DHA) sangat labil pada kedua keadaan di atas, maka selama pengolahan buah dan sari buah sebaiknya dilakukan pada kondisi deaerasi (kandungan oksigen rendah) wadah yang digunakan terbuat dari gelas atau stainless steel, dan aktivitas enzim harus dicegah. Walaupun kehilangan vitamin C pada pembuatan sari buah hanya sedikit, tetapi kehilangan selama penyimpanan mungkin terjadi dalam jumlah besar, dan sebaiknya penyimpanan dilakukan pada suhu 10°C atau kurang.

Stabilitas vitamin C biasanya meningkat dengan penurunan suhu penyimpanan, akan tetapi selama pembekuan terjadi kerusakan yang cukup besar. Kerusakan ini bervariasi untuk jenis pangan, tetapi suhu penyimpanan di bawah -18°C dapat menyebabkan kerusakan yang cukup berarti. (Andarwulan, 1989).

2.1.4 Manfaat

Di dalam tubuh terdapat suatu molekul radikal bebas yang dikategorikan molekul perusak, mengoksidasi berbagai biomolekul dan seluruh sel yang diyakini dapat menyebabkan penuaan dini, penyakit jantung, dan memicu terbentuknya sel kanker. Untuk melawan molekul ini diperlukan antioksidan. Disini diperlukan

vitamin C yang merupakan suatu antioksidan yang baik karena mampu mencegah terbentuknya molekul-molekul tersebut.

Vitamin C merupakan antioksidan dalam sistem biologis yang larut dalam air dan dengan mudah dapat menangkap zat-zat pemicu penyakit kanker, dengan demikian berperan untuk mencegah reaksi kerusakan oksidatif terhadap biomelekul. Vitamin C dapat mencegah terjadinya kanker melalui berbagai mekanisme termasuk inhibisi terhadap kerusakan oksidatif dari DNA, mencegah reaksi pembentukan karsinogen nitrosamin (suatu karsinogen) dari reaksi nitrit dan nitrat (biasanya ada dalam makanan dan asap rokok) dengan amina, baik di luar tubuh maupun dalam saluran pencernaan. Secara *in vivo*, vitamin C menghalangi reaksi nitrosasi dengan menangkap nitrit, sehingga reaksi pembentukan nitrosamin tidak terjadi. Konsentrasi dari mutagen dalam usus besar hasil fermentasi menjadi rendah karena vitamin C, sehingga kasus kanker kolon (usus besar) berkurang.

Berdasarkan penelitian, vitamin C juga akan mencegah penyakit jantung koroner dengan menghambat oksidasi lipid. Disini dapat disimpulkan bahwa khasiat vitamin C selain sebagai antiskorbut juga berfungsi untuk menghindari penyakit degeneratif tersebut. Jadi kebutuhan vitamin C sehari-hari harus dinaikkan minimal dua kali lipat, menjadi 120 mg/hari untuk menghindari penyakit degeneratif tersebut. Hal itu berarti dengan mengkonsumsi lebih banyak buah seperti jeruk dan sayuran yang banyak mengandung vitamin C akan mencegah kanker dan proses penuaan.

Secara alamiah tubuh manusia telah dilengkapi sistem pertahanan antioksidan. Namun demikian, antioksidan tersebut tidak sepenuhnya dapat mencegah kerusakan sel. Sistem perbaikan atau pencegahan yang efisien oleh antioksidan tetap berasal dari makanan. Salah satunya adalah dengan mengkonsumsi makanan, baik buah-buahan maupun sayuran yang banyak mengandung vitamin C. Sayur dan buah-buahan merupakan sumber utama antioksidan karena mengandung tokoferol, asam askorbat, karotenoid, serta senyawa polifenol dan flavonoid. Dua jenis senyawa tersebut saat ini banyak mendapat perhatian karena merupakan komponen bioaktif pada makanan khususnya sebagai antioksidan (www.pikiran-rakyat.com).

Tabel 2.1. Kandungan vitamin C di dalam buah-buahan :

Buah	Vitamin C /100 gr
Apel	6 mg
Pear Asia	4 mg
Alpukat	8 mg
Nanas	9 mg
Anggur	34 mg
Jambu Tropical	183 mg
Mangga	28 mg
Jeruk	53 mg
Pepaya	62 mg
Tomat	19 mg

www.naturalhub.com

Vitamin C tidak terdistribusi secara luas dalam bahan makanan seperti kebanyakan vitamin lainnya. Vitamin C ditemukan hampir sepenuhnya dalam makanan nabati, yaitu sayuran dan buah-buahan segar, tetapi tidak ditemukan dalam sereal atau sayuran kacang-kacangan yang kering (Gaman dan Sherington, 1992).

Vitamin C dapat membantu pembentukan protein kolagen dan bergabung dengan jaringan tulang, kulit dan darah untuk melindungi dan menjaga kesehatan tubuh. Vitamin C membantu dalam sistem kekebalan tubuh karena dapat menetralkan racun dengan memproduksi antibodi.

Vitamin C berperan untuk berbagai fungsi biokimia lain yang membantu tubuh untuk menyerap zat besi dan menghilangkan histamin yaitu suatu komponen penyebab radang. Kandungan vitamin C pada makanan dipengaruhi oleh musim, transportasi pada saat penjualan dan waktu penyimpanan. Suatu studi dilakukan oleh Hallberg (1987), menunjukkan bahwa penyerapan besi dari bahan makanan dapat ditingkatkan apabila mendapat masukan vitamin C sedikitnya 25 mg setiap hari pada setiap makanan. Masukan vitamin C yang tinggi juga harus diiringi dengan mengkonsumsi makanan yang mengandung gizi tinggi.

Tabel 2.2. Kebutuhan vitamin C pada perempuan dan laki-laki dengan berbagai tingkat usia :

Usia	Perempuan	Laki-laki
0 – 6 bulan	40 mg	40 mg
6 – 12 bulan	50 mg	50 mg
1 – 5 tahun	20 mg	20 mg
5 – 10 tahun	25 mg	25 mg
10 – 18 tahun	45 – 75 mg	45 – 65 mg
18 tahun keatas	90 mg	75 mg
Hamil	+45 mg	-
Perokok	+35 mg	+35 mg

www.acu-cell.org

Vitamin C juga berfungsi pada sistem kardiovaskuler karena kemudahannya untuk di metabolisme oleh tubuh dan akan mengubah asam amino tertentu ke dalam neurotransmitters. Pada jaringan kulit, tulang dan gigi vitamin C bermanfaat untuk pemeliharaan, pencegahan penyakit dan penyembuhan luka. Dalam hal ini vitamin C berfungsi sebagai aspirin alami yang diproduksi oleh tubuh.

2.2 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

2.2.1 Prinsip Dasar

KCKT merupakan suatu teknik aplikasi dari instrumentasi kromatografi cair dengan pengembangan dari kromatografi gas. Fasa gerak yang digunakan dapat berupa campuran larutan organik, larutan buffer atau pelarut organik, tergantung dari jenis metode kromatografi yang digunakan (Lindsay, 1987).

Maksud dan tujuan analisis dengan KCKT hanya ada dua hal yaitu didapatnya pemisahan yang baik dalam waktu proses yang relatif singkat. Untuk tercapainya maksud dan tujuan tersebut, maka diperlukan penatalaksanaan yang betul-betul sudah dipersiapkan dan diperhitungkan, antara lain :

- Dipilih pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur yang sesuai untuk komponen yang dipisahkan.
- Berkaitan dengan pemilihan pelarut pengembang (solvent) maka kolom yang dipakai juga harus diperhatikan.
- Detektor yang memadai.
- Pengetahuan dasar tentang KCKT serta pengalaman dan ketrampilan kerja yang baik.

(Suharman dan Muh. Mulja, 1995)

Pada KCKT, partikel dengan dimensi yang bervariasi digunakan sebagai penunjang stasioner. Fase stasioner ini merupakan cairan yang dilapiskan pada permukaan zat padat penyangga dan dipakai sebagai bahan isian (packing material) untuk kolom. Ikatan antara zat padat penyangga dan fase stasioner dapat berupa ikatan fisik maupun kimiawi. Dalam KCKT, baik fase stasioner maupun fase mobil berupa cairan / pelarut yang digunakan tersebut harus tidak bercampur sehingga pelarut yang lebih polar biasanya digunakan sebagai fase stasioner (Adnan, 1997).

Banyaknya cairan pada kolom jumlahnya sedemikian rupa sehingga hanya cukup menghasilkan sedikit tekan untuk memelihara aliran fase bergerak. Bila dibandingkan dengan kromatografi gas-cair, maka KCKT lebih bermanfaat untuk isolasi zat yang tidak mudah menguap, demikian juga zat yang secara termal tidak stabil (Khopkar, 2002). Zat-zat dengan kepolaran berbeda, yaitu antara sedikit polar sampai polar dapat dipisahkan dengan KCKT berdasarkan partisi cair-cair.

Pemisahan dengan KCKT biasanya dilakukan pada temperatur kamar. Yang perlu diperhatikan adalah temperatur dari kolom yang akan digunakan. Temperatur kolom diatur sedemikian rupa sehingga mempercepat pendekatan ke kesetimbangan. Temperatur yang tinggi juga akan mengurangi viskositas cairan gerak, dengan akibat bahwa laju aliran yang diinginkan akan menuntut selisih tekanan yang agak kecil. Tetapi titik didih pelarut-pelarut kita yang lazim merupakan batas bagi kenaikan temperatur (Day dan Underwood, 1986).

Sebelum diperkenalkannya KCKT, kromatografi cairan tidak sepopuler kromatografi gas. Dengan makin meluasnya penggunaan teknik kromatografi untuk analisis senyawa-senyawa organik, termasuk bahan makanan, maka penggunaan KCKT menjadi makin banyak. Makin populernya penggunaan KCKT disebabkan teknik ini mempunyai beberapa keunggulan yang disebutkan di bawah ini.

1. KCKT dapat menangani senyawa-senyawa yang stabilitasnya terhadap suhu terbatas, begitu juga volatilitasnya bila tanpa menggunakan derivatisasi. Sebagai contoh misalnya analisis beberapa jenis gula, dapat dikerjakan dengan KCKT tanpa proses derivatisasi dulu.
2. KCKT mampu memisahkan senyawa yang sangat serupa dengan resolusi yang baik.
3. Waktu pemisahan dengan KCKT biasanya sangat singkat, sering hanya dalam waktu 5 – 10 menit, bahkan kadang-kadang kurang dari 5 menit untuk senyawa yang sederhana.
4. KCKT dapat digunakan untuk analisis kuantitatif dengan baik dan dengan presisi yang tinggi, dengan koefisien variasi dapat kurang dari 1 %. Untuk sampel bahan makanan, biasanya koefisien variasinya lebih tinggi disebabkan preparasinya yang lebih sukar, misalnya ekstraksi dan proses pemurnian yang lain.
5. KCKT juga merupakan teknik analisis yang peka (Adnan, 1997).

-KCKT dapat melakukan pemisahan campuran yang rumit dalam beberapa menit atau bahkan detik dengan hasil yang bagus sekali, dan dengan integrasi elektronik memperoleh luas di bawah pita elusi maupun cetak komputer dari analisis yang lengkap (Day dan Underwood, 1986)

Efisiensi yang maksimal dalam KCKT dapat dicapai dengan mengatur kecepatan aliran fase mobil yang kecil, sehingga analisis akan memakan waktu lama. Untuk menanggulangi hal tersebut dapat dikerjakan dengan :

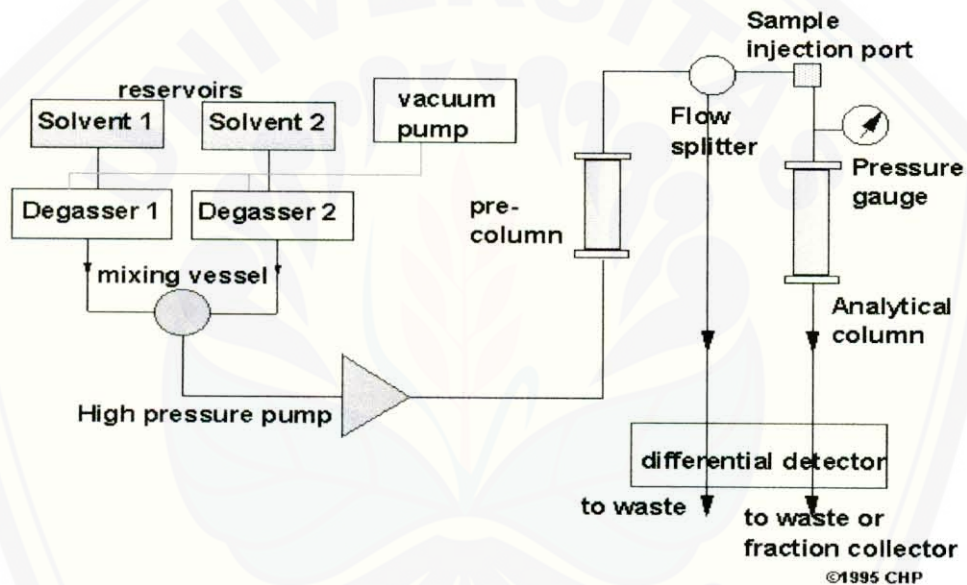
- Menaikkan tekanan aliran fase mobil.
- Mengurangi jarak yang ditempuh zat yang dianalisis dalam proses partisi.

Caranya ialah dengan menggunakan bahan isian (packing material) yang diameternya kecil.

2.2.2 Instrumentasi

Susunan alat-alat yang dipakai dalam KCKT tidak banyak berbeda dengan kromatografi gas-cair, hanya disesuaikan dengan sifat khusus dari kromatografi cairan. Komponen utama alat yang dipakai ialah : reservoir zat pelarut untuk fase mobil, pompa, injector, kolom, dan detektor (Adnan, 1997).

Diagram dari susunan alat tersebut adalah sebagai berikut :



Gambar 2.3 satu set seperangkat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

a. Reservoir Pelarut

Zat pelarut yang dipakai polaritasnya dapat bervariasi tergantung dari senyawa yang dianalisis. Yang perlu diperhatikan adalah, bahwa tempat pelarut tersebut harus memungkinkan untuk proses menghilangkan gas atau udara yang ada dalam pelarut tersebut. Cara yang dipakai dapat bermacam-macam, misalnya dengan pemanasan, perlakuan vakum, atau dengan mengalirkan gas yang bersifat inert seperti helium.

Menghilangkan gas atau udara yang ada dalam pelarut dipakai sebagai fase mobil penting, karena pada waktu dialirkan dengan memompa dapat terbentuk gelembung gas dalam aliran pelarut tersebut, sehingga dapat menyebabkan aliran menjadi diskontinyu yang seterusnya dapat mengganggu kromatogram yang dihasilkan (Adnan, 1997).

b. Pompa

Pengembangan metode analisis dengan KCKT dihadapkan dengan persoalan prinsip yaitu mendesain pompa yang memadai. Beberapa persyaratan sistem pompa KCKT adalah :

- Memberikan tekanan sampai 6000 psi (lbs / in^2).
- Sama sekali bebas dari pulsa.
- Memberikan kecepatan aliran 0,1 – 10 ml / menit.
- Alirannya terkontrol dengan reproduibilitas 0,5 % atau kurang.
- Anti karat oleh sebab itu seal pompa terbuat dari bahan baja atau Teflon.

(Suharman dan Muh. Mulja, 1995)

Pompa diperlukan untuk mengalirkan pelarut sebagai fase mobil dengan kecepatan dan tekanan yang tetap. Gangguan pada pompa biasanya karena perawatan yang kurang teratur, pelarut yang tidak difiltrasi dengan baik, adanya elektrolit yang mengandung kadar klorida yang tinggi pada pH yang rendah, dan terjadinya endapan dalam pompa (Adnan, 1997).

Ada tiga macam jenis pompa yang banyak dipakai pada KCKT yaitu : (1) screw driven pump, (2) reciprocating pump, dan (3) pneumatic pump. Pompa jenis puntiran sekrup (screw driven pump dan pompa tarik dorong (reciprocating pump) sering digunakan. Screw driven pump menghasilkan pengaliran pelarut bebas pulsa. Sedangkan reciprocating pump lebih sering digunakan meskipun menghasilkan aliran berpulsa yang kelak harus ditiadakan. Reciprocating pump lebih populer karena dapat menggunakan jumlah volume yang tidak terbatas sedangkan pada screw driven pump tidak. Selain itu elusi gradient juga hanya bisa dilakukan oleh reciprocating pump.

Pada pneumatic pump, cairan tidak mudah dikompresi sehingga tekanan tinggi yang terbentuk pada sistem pompanya tidak berbahaya. (Khopkar, 2002)

Setiap pompa KCKT yang baik harus dapat melaksanakan sistem elusi dari isokratik yang sederhana sampai sistem elusi dengan pemompaan otomatis yang sempurna. (Suharman dan Muh. Mulja, 1995)

Tekanan yang diperlukan tergantung dari ukuran kolom dan viskositas dari pelarut. Pada kolom yang umum dipakai, dengan diameter 5 mm dan kecepatan aliran 1 – 2 ml / menit, tekanan yang diperlukan mencapai 400 bar, tergantung panjang kolom dan ukuran partikelnya. Untuk kolom yang berdiameter lebih kecil maka kecepatan aliran akan menjadi lebih kecil juga. Sebaliknya, pada kolom yang lebih lebar, kecepatan alirannya juga lebih besar atau akan naik. Pompa yang baik dapat mengatur kecepatan aliran 10 – 20 μ l / menit. Karena identifikasi puncak-puncak kromatogram didasarkan pada waktu retensi, maka aliran pelarut diharapkan dapat konstan. Hal ini hanya dapat tercapai, bila sistem pemompaannya dapat diandalkan (Adnan, 1997).

c. Injektor

Pemasukan atau injeksi sampel untuk analisis dengan metode KCKT merupakan satu hal yang sangat penting. Walaupun kolom telah memadai tetapi pada saat injeksi sampel dilakukan tidak tepat maka hasil kromatogram yang ditampilkan akan tidak memadai. Sampel dimasukkan dalam sistem injeksi dengan penyuntik hiperdemik. Sampel sampai sejumlah 2 – 100 μ l dapat ditampung dalam sistem injeksinya (Khopkar, 2002).

Ada tiga macam sistem injektor pada KCKT yaitu : (1) injektor dengan memakai diafragma septum, (2) injektor tanpa septum, dan (3) injektor dengan pipa dosis. Untuk saat ini yang sering dipakai pada KCKT adalah sistem dengan pipa dosis. Hal ini disebabkan ketetapan jumlah volume sampel yang diinjeksikan akan sangat penting untuk analisi kuantitatif dan keadaan ini hanya dapat diantisipasi dengan injektor distem pipa dosis (Sampel Loop). Prinsip kerja dari pipa dosis adalah "*Load-inject*", ini berarti pada keadaan pertama sampel akan masuk loop dan

akhirnya dengan volume yang tidak berkurang sedikitpun segera masuk menuju kolom pemisahan (Suharman dan Muh Mulja, 1995).

Sampel-sampel dimasukkan ke dalam fase gerak sebelum kolom. Ini dapat dilakukan dengan penyuntikan langsung dengan siring mikro lewat septum elastomer yang menyegel sendiri (mendedap kembali) atau dengan gelung (loop) menyisipkan ke dalam suatu katup pencuplikan sampel yang khusus, yang kemudian disapu bersih oleh fase mobil (Day dan Underwood, 1986).

Pada waktu sampel diinjeksikan ke dalam kolom, diharapkan agar aliran pelarut tidak mengganggu masuknya keseluruhan sampel ke dalam kolom. Sampel dapat langsung diinjeksikan ke dalam kolom atau digunakan katup injeksi, di mana sampel diinjeksikan ke dalam *holding loop* Loop yang mempunyai volume antara 10-20 μl dapat dipenuhi oleh sampel. Dalam hal seperti ini akan dapat dihasilkan presisi yang tinggi. Hanya karena sampelnya besar dapat mengganggu resolusi kromatogram yang dihasilkan. Kelemahan penggunaan injektor dengan loop ialah bahwa sampel diinjeksikan ke dalam fase mobil yang letaknya tidak di ujung kolom. Injektor dengan loop dapat memberikan tendensi terjadinya pelebaran puncak (band broadning). Injeksi langsung ke dalam kolom dapat dilakukan dengan syringe. Injeksi dengan syringe dapat dilakukan melalui septum atau tanpa septum. (Adnan, 1997).

d. Kolom

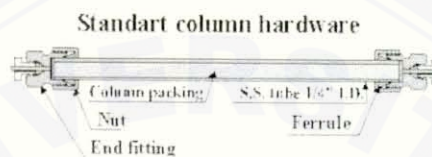
Kolom pada KCKT merupakan bagian yang sangat penting sebab separasi komponen-komponen sampel akan terjadi di dalam kolom. Oleh karena itu harus diperhatikan dengan seksama tiga hal berikut :

- pemilihan kolom yang sesuai,
- pemeliharaan kolom,
- uji terhadap spesifikasi kolom (walaupun kolom tersebut merupakan kolom yang siap pakai).

Kolom akan menjadi kunci penentu keberhasilan pemisahan komponen-komponen sampel serta hasil akhir analisis dengan KCKT (Suharman dan Muh. Mulja, 1995).

Kolom dapat berupa gelas atau baja tidak berkarat. Kolom gelas dapat menahan tekanan sampai 600 psi. panjang kolom bervariasi dari 15 – 150 cm. pengisi kolom biasanya adalah silica gel, alumina dan elit. Pengisi kolom seperti partikel *pellicular*, yaitu butiran gelas yang dilapisi dengan materi berpori seperti silica gel, alumina atau penukar ion juga sering digunakan (Khopkar, 2002).

Berikut adalah gambar dari kolom pada KCKT :



Gambar 2.4 : Kolom kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kolom dalam KCKT dibuat lurus untuk efisiensi kolom. Kolom biasanya dibuat dengan diameter sangat kecil dan pendek. Apabila kolom dibuat dengan diameter sangat kecil (kolom mikro), agar kepekaan menjadi lebih teliti, menghemat larutan pengembang, memperluas kemampuan detektor, dan sampel yang dianalisis sedikit. Sedangkan kolom dibuat pendek agar menghasilkan resolusi yang baik, memperkecil harga diameter rata-rata partikel fase diam, dan waktu retensi singkat. Namun kolom tersebut memiliki kelemahan yaitu sela-sela partikel lebih mudah tertutup oleh kotoran, jadi harus seringkali dicuci dan kemurnian larutan pengembang harus dijaga. (Suharman dan Muh Mulja, 1995)

Ukuran kolom yang umum dipakai ialah dengan panjang 10 – 25 cm dan berdiameter 4,5 – 5,0 mm, yang diisi dengan fase stasioner berukuran rata-rata 5 – 10 μm , dan dibuat dari logam stainless steel. Perlu diketahui bahwa efisiensi kolom salah satunya tergantung dari besarnya partikel fase stasioner. Oleh karena itu bila ukuran fase stasioner lebih kecil, maka tinggi plat teoritik akan berkurang, sehingga jumlah plat teoritik akan bertambah, yang akan meningkatkan efisiensi kolom. Dengan kolom yang pendek dan efisien, pemisahan akan berjalan cepat (Adnan, 1997).

Kadang-kadang terdapat prakolom sebelum suatu kolom analitis. Prakolom ini merupakan suatu piranti kecil dan tidak mahal dengan fase stasioner yang cocok.

Tujuan diletakkannya prakolom yaitu untuk memungut materi partikel dan pengotor-pengotor pelarut yang mungkin mengotori kolom selama analisis. (Day dan Underwood, 1986)

e. Detektor

Detektor dalam KCKT akan memberikan informasi kepada kita tentang segala sesuatu yang diperlukan sehubungan dengan tujuan analisis kualitatif dan kuantitatif dengan KCKT (Suharman dan Muh. Mulja, 1995).

Detektor yang digunakan untuk KCKT bergantung pada tipe sampel yang dipisahkan. Dasar pengukuran UV, absorpsi IR, pendar fluor, indeks refraksi, konduktansi, polarografi, Geiger counter, spektroskopi massa dapat digunakan. Kecuali indeks refraksi, detektor tersebut bersifat sangat selektif (Khopkar, 2002)

Sifat-sifat atau syarat detektor adalah :

- Mempunyai sensitivitas yang tinggi dengan rentang sensitivitas $10^{-8} - 10^{-15}$ g solute per detik.
- Bersifat linier untuk jangka konsentrasi tertentu.
- Dapat mendeteksi eluen tanpa mempengaruhi resolusi kromatogram.
- Tidak terlalu peka terhadap perubahan berbagai parameter terutama suhu dan tekanan.
- Kesetabilan dan reproduksibiliti yang sangat baik.
- Mudah didapat dan mudah pemakaiannya oleh operator.
- Tidak merusak sampel.
- Dapat menghilangkan *zone broadening* dengan adanya pengaruh minimal interval volume.

(Adnan, 1997).

Detektor yang paling umum didasarkan pada indeks bias dari eluat kolom, karena hampir zat terlarut apa saja akan menghasilkan suatu larutan yang indeks biasnya berbeda dengan indeks bias pelarut. Detektor ini mengindera beda itu dan menurunkan suatu isyarat listrik yang proporsional, yang digandakan dan direkam untuk menghasilkan kromatogram. (Day dan Underwood, 1986)

Detektor yang sering dipakai adalah detektor ultraviolet. Detektor UV umumnya digunakan untuk analisis bahan organik bergugus fungsi. Persyaratan yang harus dipenuhi untuk detektor ini ialah harus digunakan sinar monokromatik, atau sinar dengan panjang gelombang yang sempit (2 – 4 nm) dalam sistem spektrometrinya dan tidak terjadinya perubahan sifat solute yang dideteksi. Oleh karena itu yang paling baik bekerja pada konsentrasi yang rendah (Adnan, 1997).

Detektor Ultraviolet dapat mendeteksi sampai 10^{-9} g atau 100 bpm (bagian per miliar) dalam 10 μ l cuplikan. Detektor ini menghasilkan kepekaan yang sangat baik untuk senyawa tertentu, tetapi hamper tidak peka sama sekali terhadap senyawa lain. Tanggapan nisbi detektor ini dapat memberikan informasi kualitatif mengenai komponen cuplikan. Ciri khas dari detektor UV adalah mempunyai derajat kecocokan dengan pemrograman aliran yang jarang dipakai (Edward dan Robert, 1978).

2.3 Retensi

Pengukuran retensi meliputi waktu retensi dan volume retensi. Nilai retensi tergantung pada interaksi permukaan dan jumlah adsorben di permukaan. Waktu retensi adalah selang waktu yang diperlukan oleh linarut (solute) mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detektor, dinyatakan sebagai t_R . Waktu retensi akan berbanding terbalik dengan kecepatan alir eluent. Semakin lambat kecepatan alir eluent maka semakin besar nilai waktu retensi, dan sebaliknya. Hasil dari waktu retensi dan kecepatan alir eluent disebut Volume Retensi, ini merupakan parameter retensi yang lebih global. Volume retensi, V_R menggambarkan volume eluent dari komponen partikel tertentu yang bergerak melewati kolom.

Komponen volume retensi dibedakan menjadi dua bagian :

1. Volume retensi yang berkurang (reduced retention volume), merupakan jumlah eluent yang bergerak melewati kolom beberapa lama setelah komponen berada di permukaan.
2. Waktu tambat, V_o merupakan jumlah eluent yang bergerak melewati kolom ketika komponen bergerak bersama dengan fase cair.

Volume retensi tidak berhubungan dengan kecepatan alir analit, tetapi bergantung pada parameter geometrik pada kolom. Komponen yang sama akan memberikan V_R yang berbeda jika menggunakan kolom yang berbeda dengan jenis adsorben sama.

Yang paling umum dan mendasar untuk parameter retensi adalah perbandingan volume retensi dan dead volume (k)

$$k = V_R / V_o \quad \dots\dots\dots(1)$$

Kapasitas kolom di dalam sistem KCKT tidak bergantung pada parameter geometrik dari kolom. Ini dianggap sebagai karakteristik termodinamik dari sistem adsorben – analit – eluent. Disajikan dalam persamaan berikut :

$$k' = \frac{V_R - V_o}{V_o} \quad \dots\dots\dots(2)$$

2.4 Efisiensi Kolom

Efisiensi kolom berhubungan dengan lebar puncak. Dimana lebar puncak tergantung pada beberapa parameter yaitu kekuatan kolom, kecepatan alir dan ukuran partikel. Kecepatan alir merupakan satu parameter yang dapat bergerak dari satu tempat ke tempat lain pada kolom yang sama. Oleh karena itu, fenomena tersebut dapat dinyatakan dalam efisiensi kolom.

Perlu diketahui bahwa efisiensi kolom salah satunya tergantung dari besarnya partikel fase stasioner. Oleh karena itu bila ukuran fase stasioner lebih kecil, maka tinggi plat teoritik akan berkurang, sehingga jumlah plat teoritik akan bertambah, yang akan meningkatkan efisiensi kolom. Dengan kolom yang pendek dan efisien, pemisahan akan berjalan cepat. (Adnan, 1997)

2.5 Selektivitas dan Resolusi

Selektivitas merupakan perbandingan dari faktor kapasitas pada dua puncak, atau perbandingan dari waktu retensi yang telah ditentukan. Selektivitas menggambarkan kekuatan pemisahan adsorben yang telah bercampur dalam suatu komponen. Dinyatakan dengan persamaan berikut :

$$\alpha = \frac{VR,1 - V_0}{VR,2 - V_0} = \frac{k'1}{k'2} \dots\dots\dots(3)$$

Parameter ini tidak berhubungan dengan efisiensi kolom tetapi hanya bergantung pada komponen awal, jenis eluent, komposisi eluent dan permukaan kimia adsorben.

Resolusi menggambarkan kekuatan pemisahan suatu partikel dalam satu komponen campuran di dalam sistem kromatografi yang lengkap. Resolusi (R) menyatakan perbandingan jarak rata-rata antara dua puncak maximum dengan lebar puncak pada garis dasar. Dinyatakan sebagai berikut :

$$R = 2 \frac{VR,2 - VR,1}{W1 + W2} \dots\dots\dots(4)$$

Persamaan tersebut digunakan jika pita yang dihasilkan bentuknya seperti segitiga sama kaki pada akhir pemisahan dan nilai R akan lebih dari satu. Jika R nilainya kurang dari satu maka sinyal yang terdeteksi akan menghasilkan pita yang tumpang tindih.

Hal tersebut dapat diatasi dengan menggunakan ekspresi dari kapasitas dan efisiensi kolom sehingga persamaan R dapat ditransformasikan sebagai berikut :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \frac{k'2 - k'1}{k'2 + k'1 + 2} \dots\dots\dots(5)$$

2.6 Kromatografi Fase Terbalik

Kromatografi fase terbalik atau disebut Reserved Phase Chromatography merupakan kebalikan dari sistem kromatografi fase normal. Dalam kromatografi ini fase stasioner yang dipakai adalah senyawa polar sedangkan fase mobilnya adalah senyawa yang lebih polar daripada fase stasioner (Adnan, 1997).

Kolom kromatografi fase terbalik dapat diumpamakan sebagai “sifat molekuler” di mana rantai-rantai hidrokarbon merupakan bulu-bulu sikat tersebut. Hanya saja yang prinsip di sini adalah adsorpsi merupakan dasar mekanisme pemisahannya. Keuntungan kromatografi fase terbalik :

- Senyawa yang polar akan lebih baik pemisahannya pada kromatografi fase terbalik.
- Senyawa yang mudah terionkan (ionik) yang tidak terpisahkan pada kromatografi fase normal akan dapat dipisahkan pada kromatografi fase terbalik.
- Dengan kromatografi fase terbalik air dapat digunakan sebagai salah satu komponen pada pelarut pengembang campur.

(Suharman dan Muh. Mulja, 1995)

2.7 Jeruk (*citrus*)

Jeruk sudah sangat dikenal oleh masyarakat luas. Buah ini merupakan salah satu buah yang umum dikonsumsi oleh masyarakat. Jeruk (*Citrus sp. Famili Rutaceae*) bukanlah tanaman asli Indonesia. Aslinya berasal dari Asia Tenggara terutama dataran Cina. Jeruk termasuk ke dalam famili Rutaceae yang meliputi banyak genera. Akan tetapi, pada dasarnya citrus ini dapat dibedakan menjadi tiga kelompok, yakni :

1. Primitif, yang belum dimanfaatkan orang.
2. Kerabat dekat citrus yang sebagian telah dimanfaatkan orang.
3. Citrus yang sebenarnya, yang telah dimanfaatkan dan dibudidayakan orang. Kelompok jeruk ini terdiri atas dua subgenera, yaitu papeda dan eucitrus. Papeda ini dagingnya tidak enak dimakan karena banyak mengandung minyak acrid.

(Sunarjono H, 1987)

Jeruk mempunyai nama ilmiah *Citrus sinensis*, termasuk buah yang memiliki banyak varietas dengan berbagai keunggulan masing-masing dari mulai yang memiliki rasa asam hingga manis. Jeruk mengandung phytochemical yang disebut hesperidin yang berfungsi sebagai antioksidan. Jeruk juga sumber pektin yang berfungsi menurunkan tekanan darah dan termasuk buah rendah serat namun sumber vitamin C dan folate. Jeruk memberi banyak kegunaan bagi manusia, sebagai contoh

aromanya mulai digunakan dalam aroma terapi yang berguna untuk menenangkan syaraf. Rasa jeruk yang masam dapat menambah selera makan karena dapat membantu pencernaan (www.vision.net.id).

2.7.1 Kandungan dan Khasiat Buah Jeruk (*citrus*).

Jeruk (*citrus*) adalah buah-buahan yang nilai gizinya cukup tinggi dan merupakan salah satu bahan makanan tambahan yang mengandung zat-zat pengatur proses dalam tubuh manusia yang setiap hari mutlak dibutuhkan. Karena cukup tinggi kadar vitamin C-nya maka buah jeruk (*citrus*) dapat dimakan sebagai pencegah kekurangan vitamin C, begitu pula dapat menyembuhkan penyakit influenza (Joesoef, 1989).

Sari buah jeruk (*citrus*) banyak mengandung vitamin C sangat baik karena selain menstimulasi sistem kekebalan tubuh, juga menghilangkan sumbatan lendir di tenggorokan, rongga hidung, paru-paru dan perut. Berguna pula untuk membersihkan liver dan menghilangkan rasa sakit di tubuh akibat influenza. Campuran sari buah jeruk nipis dan madu sangat berkhasiat menyembuhkan radang tenggorokan dan amandel. Bagi orang yang memiliki gangguan lambung bisa memilih jeruk (*citrus*) yang tidak terlalu asam (www.pondokrenungan.com).

Minum perasan air jeruk nipis sesaat setelah makan malam, dapat membantu melancarkan buang air kecil sehingga menghindari dan mencegah gejala kencing batu alias penyakit batu ginjal. Kandungan asam sitrat dalam air kemih pada penderita batu ginjal paling rendah pada malam hari dan dini hari sementara jeruk nipis memiliki kandungan asam sitrat yang tinggi. Sari jeruk nipis yang dikonsumsi sesudah makan juga dapat mencegah masalah lambung.

Tabel 2.3. Daftar kandungan gizi dalam 100 g buah jeruk :

no	Jenis jeruk	Kalori (kal)	Protein (g)	Lemak (g)	Karbohidrat (g)	Kalsium (mg)	Fosfor (mg)	Zat Besi (mg)	Vit.A (SI)	Vit B.1 (mg)	Vit C (mg)	Air (%)
1	Jeruk Manis	45,00	0.90	0.20	11.20	33.00	23.00	0.40	190.0	0.08	49.00	70-92
2	Jeruk keprok	44,00	0.80	0.20	10.90	33.00	23.00	0.40	420.0	0.07	31.00	87.30
3	Jeruk Besar	48,00	0.60	0.30	12.40	23.00	27.00	0.50	20.0	0.04	43.00	86.30
4	Jeruk Nipis	37,00	0.80	0.10	12.30	40.00	22.00	0.60	-	0.04	27.00	86.00

www.citrus-indonesia.com

Hasil penelitian menunjukkan, konsumsi buah jeruk (*citrus*) bersifat protektif terhadap penyakit degeneratif terutama kanker. Hal ini diduga karena adanya kandungan vitamin C dan zat-zat bioaktif lain yang berkhasiat mencegah penyakit kanker di dalam buah jeruk dan sejenisnya, meliputi karotenoid (terutama beta-karoten), flavonoida, limonoida, dan serat pangan yang berperan dalam pencegahan, terutama kanker dan penyakit degeneratif lainnya.

Limonoida yang terdiri atas limonin dan nomilin dalam jeruk (*citrus*) bertanggung jawab atas rasa pahit dari jeruk. Konsentrasi limonin dan nomilin dalam buah jeruk (*citrus*) sebenarnya tidak tinggi, tetapi bentuk glikosida dan limonida banyak terdapat dalam sari buah jeruk yang juga aktif mencegah berbagai jenis kanker. Limonoida belakangan ini diketahui mempunyai aktivitas untuk mencegah kanker dengan mempengaruhi aktivitas enzim GST (*Glutathione S-transferase*) dalam tubuh. GST (*Glutathione S-transferase*) merupakan enzim utama dalam sistem detoksi (penawar racun) yang dapat menetralkan zat karsinogen (pembentuk kanker) dengan cara mengkatalisasi konjugasi dari glutathion dengan zat yang bersifat karsinogenik. Konjugat glutathion yang terbentuk kurang atau tidak reaktif lagi dan mudah larut dalam air sehingga lebih cepat terekskresikan (dikeluarkan tubuh).

Dengan meningkatkan aktivitas GST (*Glutathione S-transferase*) itu, akan menghambat proses terjadinya kanker (personal.mail.yahoo.com).

Buah jeruk juga mengandung SDF (*soluble dietary fiber*), yaitu serat yang mudah terfermentasi (teragikan) dalam kolon dan berhubungan dengan metabolisme lipida dan karbohidrat. SDF (*soluble dietary fiber*) ini termasuk serat yang mudah larut. SDF yang terdapat dalam buah jeruk (*citrus*) adalah pektin, yang terdapat dalam bagian yang dapat dimakan dan yang tidak seperti kulit buah. Selain daging buah, kulit jeruk juga bermanfaat untuk sumber makan bergizi alternatif, dapat menunjang peningkatan gizi dan kesehatan bagi orang yang mengkonsumsinya. Sebelum dimanfaatkan sebagai alternatif makanan baru, sudah lama kulit jeruk digunakan sebagai pengharum. Pada kulit jeruk terdapat bintik-bintik, dalam bintik-bintik itulah terkandung minyak yang sering digunakan dalam pembuatan sabun wangi, pengharum minuman, kue ataupun es krim. Secara umum dapat dikatakan bahwa kegunaan zat-zat yang terkandung dalam kulit jeruk dapat mencegah kanker, mengurangi tekanan darah tinggi, mencegah kebutaan akibat lanjut usia. Sedangkan serat fibre yang terkandung di dalamnya berguna untuk mengurangi berat badan.

Kandungan vitamin C dalam buah jeruk (*citrus*) dapat mengalami penurunan pada saat penyimpanan. Selama proses pembekuan, kadar vitamin C buah bisa susut sampai 30 %. Sedangkan pada sari buah jeruk pekat susut vitamin C hanya 5 %. Kecilnya susut gizi pada sari buah jeruk pekat disebabkan oleh rendahnya pH dan rendahnya kadar oksigen pada produk tersebut. Namun apabila sari buah disimpan dalam lemari es dengan suhu 4°C, penurunan vitamin C rata-rata hanya 10 %, bahkan penyimpanan dalam freezer penurunannya lebih kecil lagi yaitu 6 % selama jangka waktu satu tahun. Oleh karena itu kalau membeli sari buah kemasan, pilih yang tersimpan dalam lemari es sehingga kandungan vitamin C-nya masih tinggi.

2.7.2 Jeruk Manis (*Citrus sinensis*, sp)

Jeruk manis, disebut juga jeruk peras, mempunyai nama ilmiah *Citrus sinensis*. Jeruk manis ini termasuk di dalam klasifikasi berikut ini .

- Subgenus : Eucitrus
- Genus : Citrus
- Subtripe : Citrinae
- Tribe : Citreae
- Subfamili : Aurantioideae
- Famili : Rutaceae
- Ordo : Rurales
- Klas : Dicotyledoneae
- Subfilum : Angiospermae (biji di dalam buah)
- Filum : Spermatophyta (tanaman berbiji)

Disebut jeruk manis (*Citrus sinensis*, sp) karena memang rasanya manis, tetapi ada juga rasanya manis disertai rasa asam sedikit, sehingga bisa menambah rasa segar bila dimakan atau diminum sebagai sari buah.

Pada mulanya, jeruk manis (*Citrus sinensis*, sp) dimakan sebagai buah segar atau sebagai pencuci mulut setelah makan. Akan tetapi, karena kulitnya tebal dan sulit dikupas, seringkali orang memerasnya untuk diambil airnya. Air buah jeruk ini dapat dikonsumsi dalam bentuk air buah segar, didinginkan lebih dahulu, atau dipasteurisasi supaya lebih tahan lama. Ada pula yang dipekatkan dan dijadikan tepung (Pracaya, 2000).

Buah jeruk manis (*Citrus sinensis*, sp) mempunyai nilai gizi yang cukup tinggi, banyak mengandung vitamin C untuk mencegah penyakit sariawan dan menambah selera makan. Selain vitamin C, buah jeruk manis (*Citrus sinensis*, sp) juga mengandung vitamin dan mineral lainnya yang berguna untuk kesehatan. Bila kita makan jeruk manis (*Citrus sinensis*, sp) setiap hari, maka tubuh akan sehat.

Tabel 2.4. Daftar kandungan vitamin-vitamin dan zat-zat mineral lainnya di dalam 100 g buah jeruk manis (*citrus sinensis, sp*) :

<u>Kandungan</u>	<u>per 100 g</u>
Vitamin A (I.U)	200
Vitamin B (gamma)	60
Vitamin C (I.U)	50
Protein (gr)	0,5
Lemak (gr)	0,1
Karbohidrat (gr)	10
Besi (mgr)	0,3
Kapur (mgr)	40
Fosfor (mgr)	20

(Joesoef, 1989)

Buah jeruk manis (*citrus sinensis, sp*) semakin tua, kandungan gulanya semakin bertambah, tetapi kandungan asamnya makin berkurang. Buah jeruk manis (*citrus sinensis, sp*) yang langsung terkena sinar matahari akan mengandung gula lebih banyak, demikian juga kandungan vitamin C-nya. Sedangkan kandungan asam amino berubah-ubah secara kuantitatif dan kualitatif selama perkembangan buah.

Kandungan asam sitrat jeruk manis (*citrus sinensis, sp*) pada waktu muda cukup banyak, tetapi setelah buah masak makin berkurang. Kandungan asam sitrat jeruk manis valencia yang telah masak akan berkurang sampai dua pertiga bagian. Cairan buah jeruk manis (*citrus sinensis, sp*) mengandung asam malat 1,4 – 1,8 mgm per liter.

Dalam jeruk manis (*citrus sinensis, sp*) terdapat flavonoid yaitu satu jenis senyawa yang bersifat racun/aleopati pada kulit jeruk manis, merupakan persenyawaan glucoside yang terdiri dari gula yang terikat dengan flavon. Flavonoid mempunyai sifat yang khas yaitu bau yang sangat tajam, sebagian besar merupakan pigmen warna kuning, dapat larut dalam air dan pelarut organik, mudah terurai pada temperatur tinggi. Flavonoid ini mempunyai sejumlah kegunaan, yaitu sebagai

antibiotik terhadap penyakit kanker dan ginjal serta menghambat perdarahan. Selain itu juga berfungsi sebagai bahan aktif dalam pembuatan insektisida nabati dari kulit jeruk manis (www.pikiran-rakyat.com).

Komposisi buah jeruk manis (*citrus sinensis, sp*) terdiri dari bermacam-macam, diantaranya air 70 – 92 % (tergantung kualitas buah), gula, asam organik, asam amino, vitamin, zat warna, mineral, dan lain-lain. Kandungan air di dalam kulit buah 70 – 83 %, sedangkan pada daging buah 85 – 90 %.

Kandungan vitamin C pada jeruk manis (*citrus sinensis, sp*) terdapat dalam sari buah, daging, dan kulit, terutama terdapat pada bagian flavedo atau exocarp (lapisan terluar kulit buah). Seperempat bagian dari total kandungan vitamin C buah jeruk manis terdapat di dalam sari buahnya. Inositol banyak terdapat pada kulit dan sari buah. (Pracaya, 2000)

BAB 3. METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Agustus 2006 sampai Maret 2007 di Laboratorium Kimia Analitik dan Kimia Organik Jurusan Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beaker glass, gelas ukur (10 dan 50ml), pipet tetes, pipet volume (5, 10, 25, dan 50 ml), labu ukur (100 dan 250 ml), pipet Mohr, bola pipet, erlenmeyer, botol semprot, pH meter, sentrifugasi, ultrasonic degassing, corong Buchner, corong pisah dan seperangkat alat KCKT (terdiri dari pompa double piston tipe Waters Asosiasi, Column C-18 Bondapak Waters, Sampel Loop injector Waters Asosiasi, dan detektor UV-Vis).

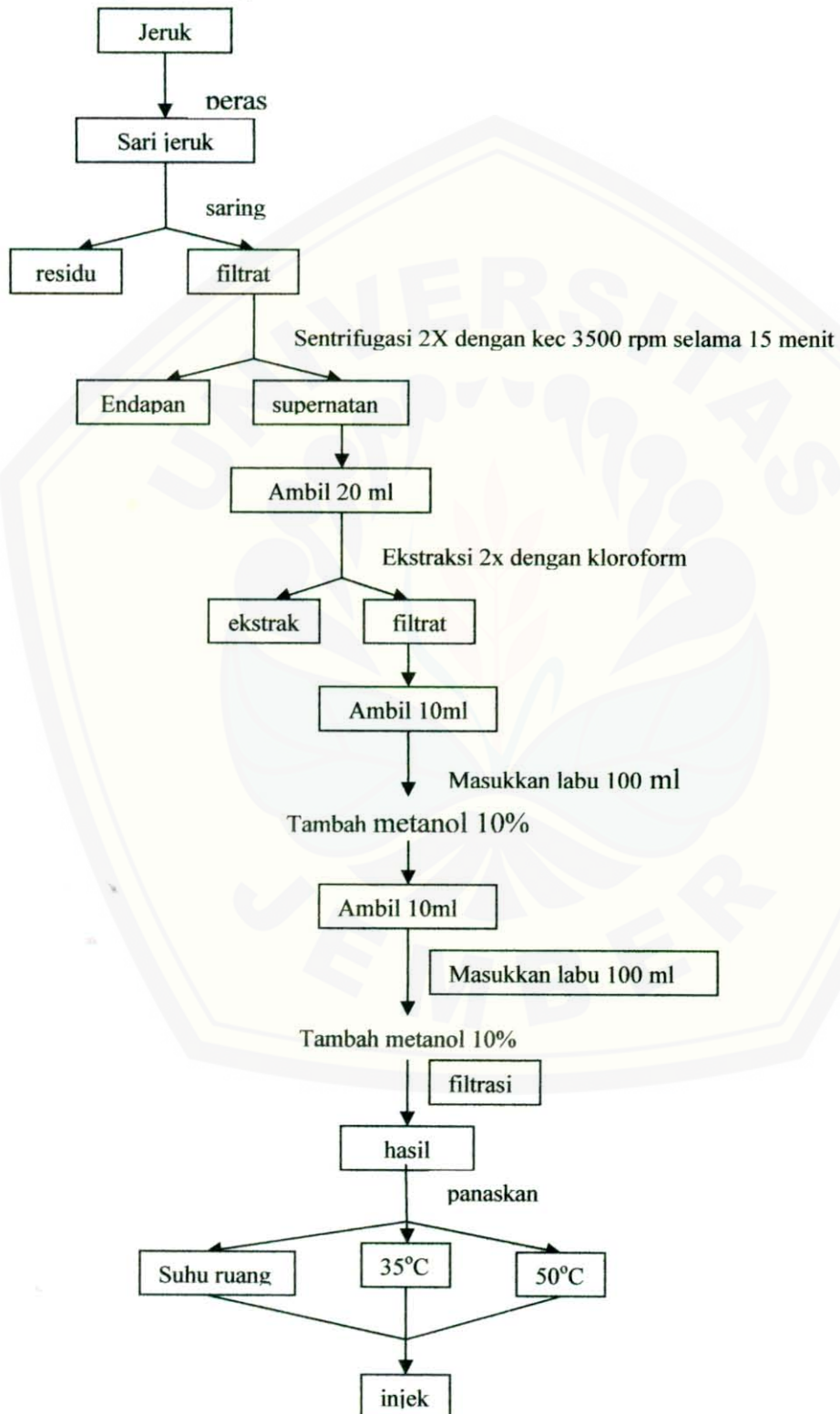
3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah jeruk manis Navel (*citrus sinensis, sp*), metanol graduated for HPLC, K_2HPO_4 (Merck), aquademin, aquades, asam askorbat (Merck), klorofom dan kertas saring Whatman dengan ukuran pori 0,2 μ m pori diameter 47 mm.

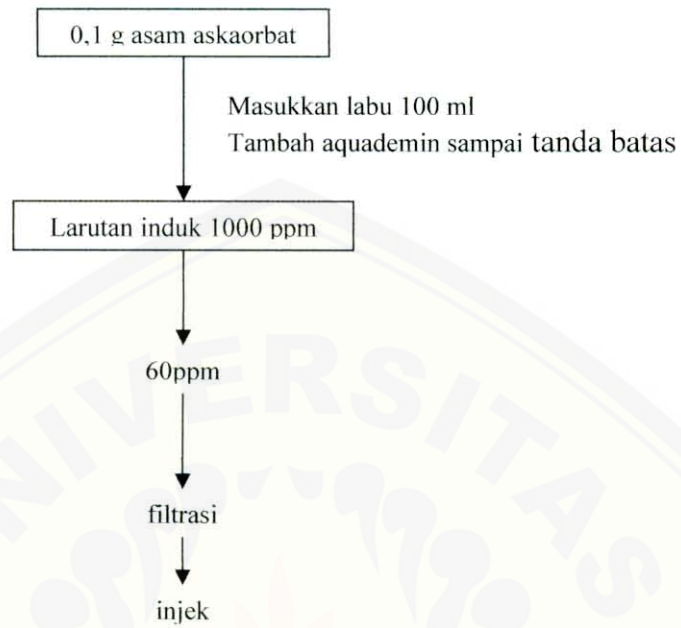


3.3 Diagram Alir

3.3.1 Preparasi Sampel



3.3.2 Preparasi Larutan Standar



3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Penyiapan Bahan

a. Penyiapan Larutan Standar

Larutan standar asam askorbat dibuat dari larutan induk asam askorbat 1000 ppm. Larutan induk 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 0,1 gram asam askorbat dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambah dengan aquademin. Dari larutan induk dibuat larutan standar asam askorbat pada konsentrasi 60 ppm di dalam labu ukur 100 ml, kemudian disaring dengan kertas saring Whatman dengan ukuran pori 2 μ pori diameter 47 mm menggunakan corong Buchner.

b. Penyiapan Larutan Buffer

Larutan buffer yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalium bifosfat (K_2HPO_4). Dibuat dengan melarutkan 0,25 gram kalium bifosfat ke dalam labu ukur 250 ml dan diencerkan dengan aquademin sampai tanda batas. Buffer dibuat dengan menambahkan H_3PO_4 atau KOH sedikit demi sedikit untuk mendapatkan pH yang diinginkan yaitu 4, 5, 6, dan 7. pH dikontrol dengan pH-meter.

c. Penyiapan Eluent

Eluent atau fase mobil dalam penelitian ini menggunakan campuran metanol dan larutan buffer dengan beberapa variasi perbandingan seperti pada tabel.

Laju alir	Buffer pH	Komposisi Eluent		Ulangan (kali)
		%metanol	%Buffer	
0,5; 0,7; 1,0; 1,2; 1,5ml/min	4, 5, 6, 7	20	80	3
0,5; 0,7; 1,0; 1,2; 1,5 ml/min	4, 5, 6, 7	15	85	3
0,5; 0,7; 1,0; 1,2; 1,5 ml/min	4, 5, 6, 7	10	90	3
0,5; 0,7; 1,0; 1,2; 1,5 ml/min	4, 5, 6, 7	5	95	3

d. Preparasi Sampel

Buah jeruk manis jenis Navel dengan berat 197,1 gram diperas dan diperoleh 35,7 ml sari buah. Saring sari buah kemudian Sentrifugasi 2 kali dengan kecepatan

3500 rpm selama 15 menit. Ambil 20 ml supernatan dan ekstraksi 2 kali dengan kloroform sebanyak 20 ml. Encerkan filtrat dengan metanol 10% dalam labu ukur 100 ml. Ambil 10 ml, masukkan labu ukur 100 ml dan encerkan dengan metanol 10% sampai tanda batas. Filtrasi larutan dengan kertas saring Whatman ukuran pori 2 μ pori diameter 47 mm menggunakan corong Buchner.

3.4.2 Kondisi Kromatogram KCKT

Alat KCKT yang dipakai adalah model Waters Associates dengan dilengkapi pompa Waters 515, katup injeksi Rheodyne 7125 dengan loop sampel 20 μ l (Waters Associates, Milford, MA). Kolom yang digunakan μ -bondapak C-18 berukuran 3,9 x 300 mm dengan ukuran partikel 10 μ m (Waters Associates). Deteksi dilaksanakan dengan UV-vis detektor Waters model 440 dengan panjang gelombang 254 nm.

3.5 Optimasi Parameter

a. Kecepatan Alir (flow rate) Eluen.

Mengetahui pengaruh kecepatan alir dilakukan dengan mengubah kecepatan alir pada 0,5; 0,7; 1,0; 1,2 dan 1,5 ml/min namun komposisi eluen dan pH larutan konstan. Respon yang dihasilkan diperoleh dengan membandingkan kecepatan alir dengan sinyal yang dapat dilihat dari luas sinyal.

b. pH Larutan Buffer Eluen.

Mengetahui pengaruh pH larutan buffer dilakukan dengan menggunakan kondisi optimal pada pengukuran kecepatan alir namun pH larutan buffer divariasikan pada pH 4, 5, 6 dan 7 sedangkan komposisi eluan konstan. Respon yang dihasilkan diperoleh dengan membandingkan pH larutan buffer dengan sinyal yang dapat dilihat dari luas sinyal.

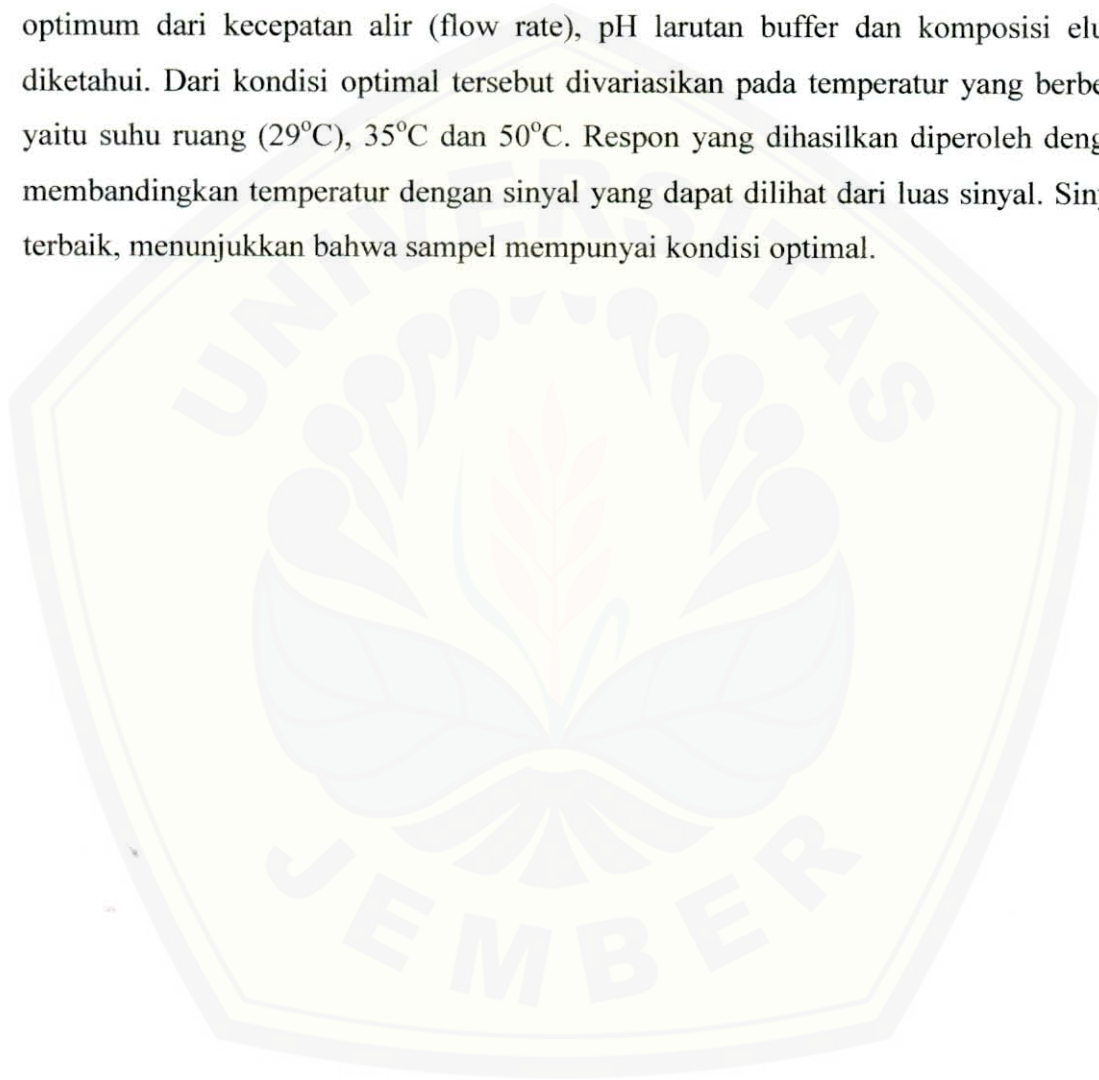
c. Komposisi Eluen (metanol + buffer).

Mengetahui pengaruh komposisi eluen dilakukan dengan menggunakan kondisi optimum kecepatan alir dan pH larutan buffer namun komposisi eluen

divariasikan 5%, 10%, 15% dan 20 %.. Respon yang dihasilkan diperoleh dengan membandingkan komposisi eluen dengan sinyal yang dapat dilihat dari luas sinyal.

d. Efek Temperatur Sampel

Mengetahui pengaruh temperatur sampel dilakukan setelah semua kondisi optimum dari kecepatan alir (flow rate), pH larutan buffer dan komposisi eluen diketahui. Dari kondisi optimal tersebut divariasikan pada temperatur yang berbeda yaitu suhu ruang (29°C), 35°C dan 50°C. Respon yang dihasilkan diperoleh dengan membandingkan temperatur dengan sinyal yang dapat dilihat dari luas sinyal. Sinyal terbaik, menunjukkan bahwa sampel mempunyai kondisi optimal.



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang saya lakukan dapat disimpulkan :

1. Kondisi optimum untuk mengetahui degradasi vitamin C di dalam buah jeruk manis jenis navel adalah dengan menggunakan kecepatan alir 1,0 ml/min, pH 5 dan eluen 10 %.
2. Ekstraksi dengan klorofom akan meloloskan vitamin C dan komponen lain dari sari buah jeruk manis tapi hanya vitamin C yang bisa tertahan oleh kolom.
3. Proses degradasi vitamin C terjadi lebih cepat dengan bertambahnya temperatur sehingga sari buah jeruk manis mengalami penurunan kandungan vitamin C.
4. Di dalam 197,1 gram buah jeruk manis jenis navel terdapat 60,72 mg vitamin C.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan variasi tekanan dan pengukuran dapat dilakukan tidak hanya untuk vitamin C tetapi perlu juga dilakukan untuk vitamin-vitamin maupun komponen-komponen yang lainnya.



DAFTAR PUSTAKA

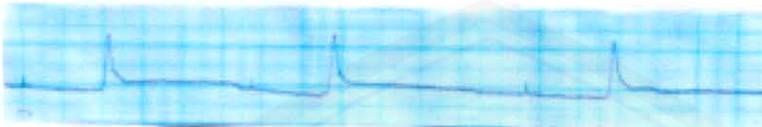
- Adnan, M. 1997. "*Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Makanan*". Yogyakarta : Penerbit Andi
- Andarwulan, N. Dan Koswara, S. 1989. "*Kimia Vitamin*". Bogor : ITB
- Bin Zhao, Su-Yin Tham, Jia Lu, Mui Hoon Lai, Lionel K.H Lee, Shabbir M Moochhala. 2004. "*Journal of Pharm Pharmaceut Society : Simultaneous determination of vitamins C, E and β -carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection.*" Hal : 200-204. Singapore
- Cristina, M.G and Luh, B.S. 1986. "*Journal of Food Science : HPLC Analysis of Organic Acids and Sugars in Tomato Juice*". Dept. of Food Science Technology. Univ. of California, Davis, CA.
- Day, R.A.Jr. and Underwood, A.L. 1986. "*Analisis Kimia Kuantitatif, Edisi Kelima*". Terjemahan Pudjaatmaka, A.H. Jakarta: Penerbit Erlangga
- Gaman, P.M and Sherrington, K.B. 1994. "*Ilmu Pangan: Pengantar Ilmu Pangan, Nutrisi dan Mikrobiologi*. Terjemahan Murdjati., Gardjito., Sri, N., agnes, M., dan Surdjono dari *The Science of Food and Introduction to Food Science, Nutrition and Microbiology*. Second Edition". Yogyakarta : Universitas Gajah Mada Press
- Hathcock, J.N. 2004. "*Vitamin and Mineral Safety 2nd Edition*". Council for responsible Nutrition. European
- Hosttmann. 1986. "*Preparative Chromatography Technique*". Sprier-Verlag Berlin Heidelberg
- Hyoung, S.L, Rouseff, R.L, and Fisher, J.F. 1986. "*Journal of Food Science vol 51 no 3 : Determination of Food Preservatives in Orange Juice by Reversed-Phase Liquid Chromatography*". Florida Department of Citrus, Citrus research and Education Center. Lake Alfred, FL.
- Joesoef, M. 1989. "*Penuntun Perkebunan Jeruk*". Jakarta : Penerbit Bhratara.

- Johnson, L.E. and Stevenson, R. 1978. "Dasar Kromatografi Cair". Terjemahan Padmawinata, K. Bandung : ITB
- Khopkar, S.M. 2002. "Konsep Dasar Kimia Analitik". Jakarta : Universitas Indonesia
- Koolman, J. 1995. "Atlas Berwarna dan Teks Biokimia". Jakarta : Penerbit Hipokrates
- Lough, W.J. and Wainer, I.W. 1995. "High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice". Western : Blackie Academic and Professional
- Nogrady, T. 1992. "Kimia Medisinal, Pendekatan Secara Biokimia edisi kedua". Bandung : ITB
- Pracaya, Ir. 2000. "Jeruk Manis. Varietas, Budidaya dan Pascapanen". Jakarta : PT. Penebar Swadaya
- Rieger, H.P. 1994. *Electrochemistry*. Second Edition. New York : Chapman and Hall, Inc.
- Shen, Yi-yang., Li, Quan-min and Wei, Wei. 2001. *Journal of the Chinese Chemical Society : Indirect Determination of Ascorbic Acid with Ammonium Sulfate and Etanol by Extraction and Flotation of Copper*. Vol 48. No 2. China
- Suharman dan Mulja, M.1995. "Analisis Instrumental". Surabaya : Universitas Airlangga
- Sunarjono, H. 1987. "Ilmu Produksi Tanaman Buah-buahan". Bandung : CV Sinar Baru
- Timmer, L. W. and Duncan, L. W. 1999. "Citrus Health Management". University of Florida. APS Press.
- Winarno, F. G. 2002. "Kimia Pangan dan Gizi". Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama

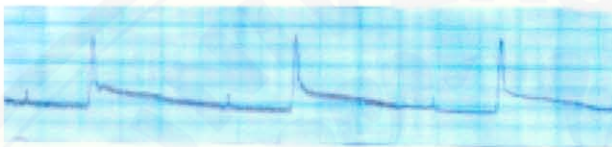
LAMPIRAN**A. Optimasi Flow Rate**

Standar yang diinjeksikan adalah larutan asam askorbat 60 ppm, pH 5, eluen 10%.

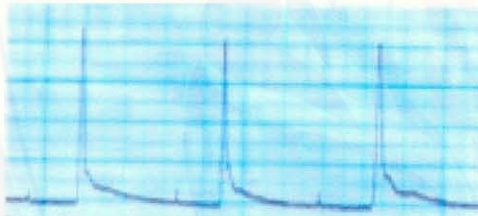
1. Flow Rate 0,5 ml/min, waktu retensi 4 menit



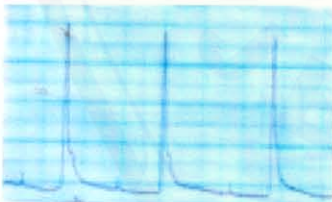
2. Flow Rate 0,7 ml/min, waktu retensi 3 menit



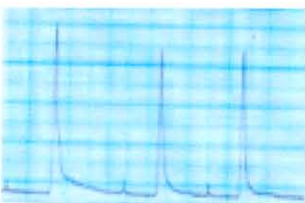
3. Flow Rate 1,0 ml/min, waktu retensi 2,3 menit



4. Flow Rate 1,2 ml/min, waktu retensi 2 menit



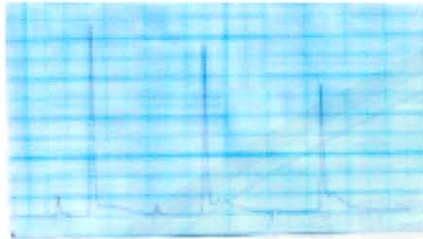
5. Flow Rate 1,5 ml/min, waktu retensi 1,7 menit



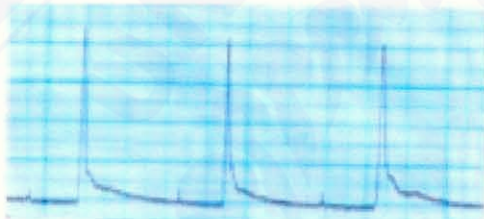
C. Optimasi eluen

Standar yang diinjeksikan larutan asam askorbat 60 ppm, flow rate 1,0 ml/min, pH 5.

1. Eluen 5%, waktu retensi 2,3 menit



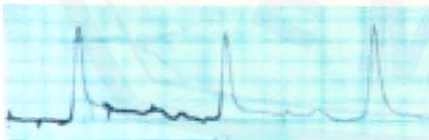
2. Eluen 10%, waktu retensi 2,3 menit



3. Eluen 15%, waktu retensi 2,3 menit

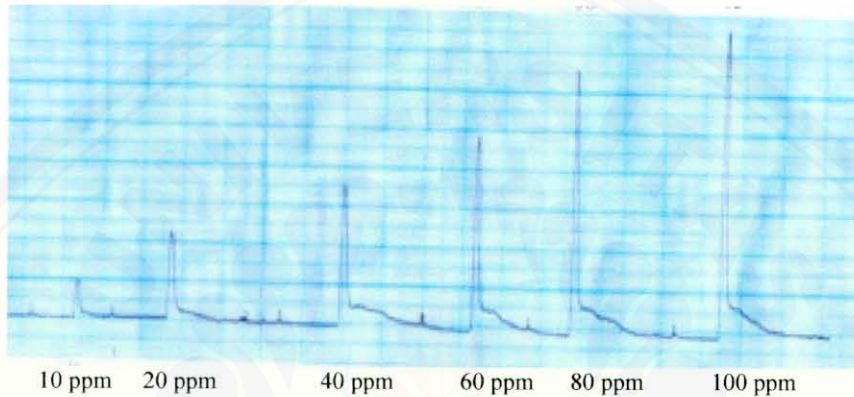


4. Eluen 20%, waktu retensi 2,3 menit



D. Kalibrasi standart asam askorbat

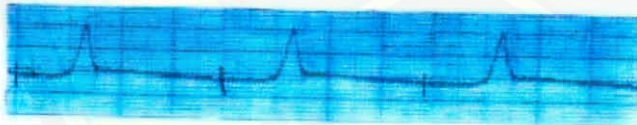
Pengukuran menggunakan KCKT dengan kolom μ bondapak C-18 Waters, sensitivity 10 mV/cm, kecepatan kertas 5 mm/min, detektor UV-Vis panjang gelombang 254 nm. Standar yang diinjeksikan adalah larutan standar asam askorbat 10, 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm, kecepatan alir 1,0 ml/min, pH 5, eluen 10% dengan waktu retensi 2,3 menit.



E. Pengukuran Sampel

Uji sampel dengan tiga kali pengulangan menggunakan kecepatan alir 1,0 ml/min, pH 5, eluen 10 % dengan waktu retensi 2,3 menit.

1. Suhu Ruang



2. Suhu 35°C

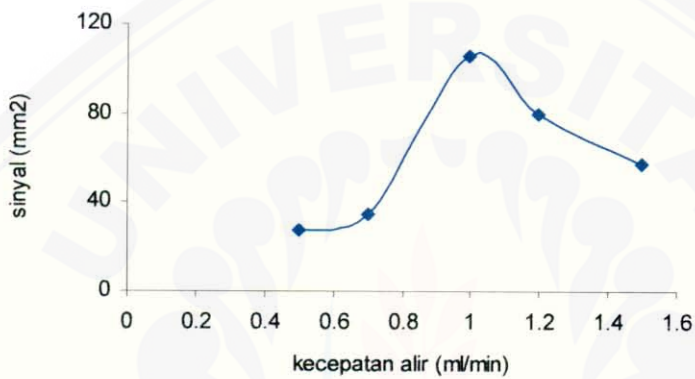


3. Suhu 50°C



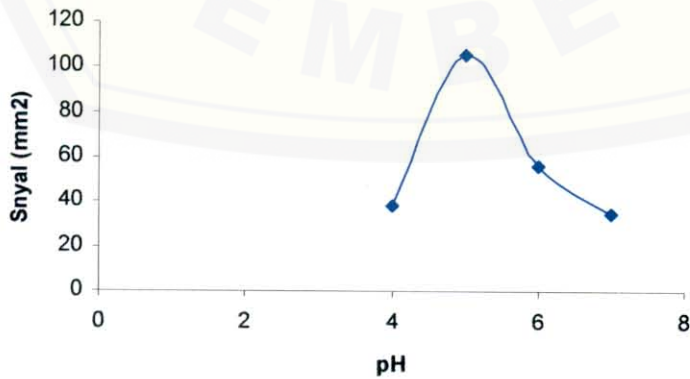
F. Grafik optimasi Flow Rate

x (ml/min)	y mm ²
0.5	27.33
0.7	35.33
1	105.83
1.2	79.33
1.5	57



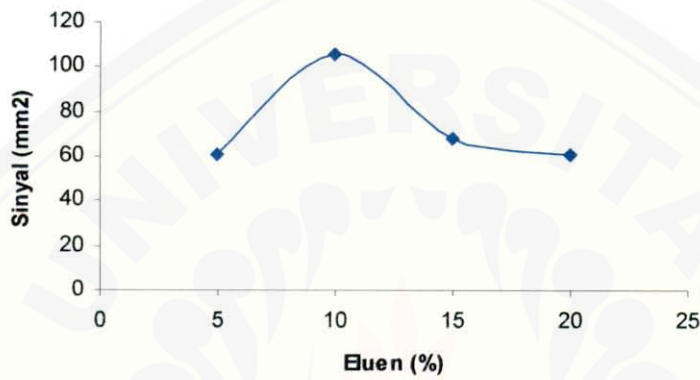
G. Grafik Optimasi Buffer

x	Y (mm ²)
4	38.67
5	105.83
6	56.67
7	35



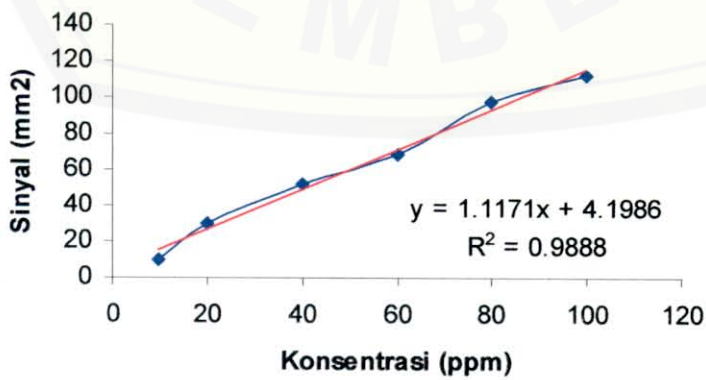
H. Grafik Optimasi Eluen

x (%)	y (mm ²)
5	61
10	105.83
15	68.33
20	60.8



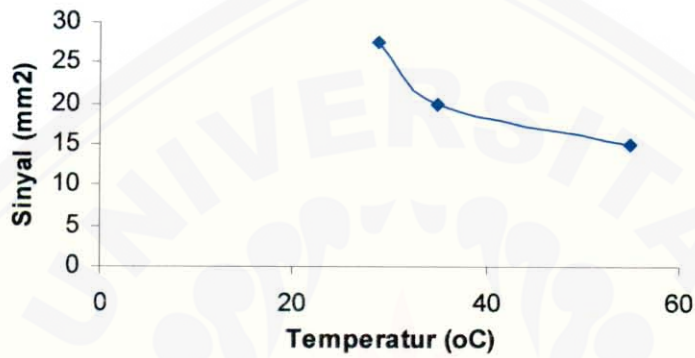
I. Grafik Kalibrasi Standart Asam Askorbat

x (ppm)	y (mm ²)
10	10
20	30
40	52.5
60	69
80	97.5
100	112.5



J. Grafik Sampel

T (oC)	y (mm ²)
29	27.5
35	20
55	15



K. Perhitungan kandungan vitamin C di dalam Jeruk Navel :

Berat jeruk (x) 197,1 gr

Berat kulit 94,3 gr

Berat serat 53,2 gr

Sari jeruk (a) 35,7 ml

Ampas (b) 1,7 ml

Sari jeruk – ampas = 35,7 ml – 1,7 ml

 = 34 ml (c)

Berat kulit + serat (y) 147,5 gr

$X - Y = 197,1 \text{ gr} - 147,5 \text{ gr}$

 = 49,6 gr (z)

$Z + b = 49,6 + 1,7$

 = 51,3

Banyaknya pengenceran = 21,18 x 50

 = 1059

$1059 : 34 = 31,15$

$\frac{31,15}{51,3} \times 100 = 60,72 \text{ mg}$

L. Alat Penelitian

1. Degassisng



2. pH Meter



3. Pompa KCKT



4. Rekorder



5. Detektor



6. Pompa vakum



7. Corong Buchner



8. Kolom KCKT



9. Sirynge Mikro



M. Bahan Penelitian

1. Methanol Graduated for HPLC



2. Membran selulosa nitrat 0,2 µm ukuran 47 mm merk Whatman



3. Eluen



4. Jeruk Manis Navel



5. Sari Buah Jeruk Manis

