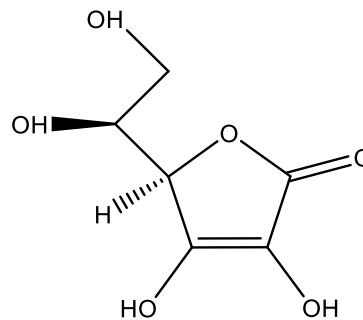


BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Vitamin C

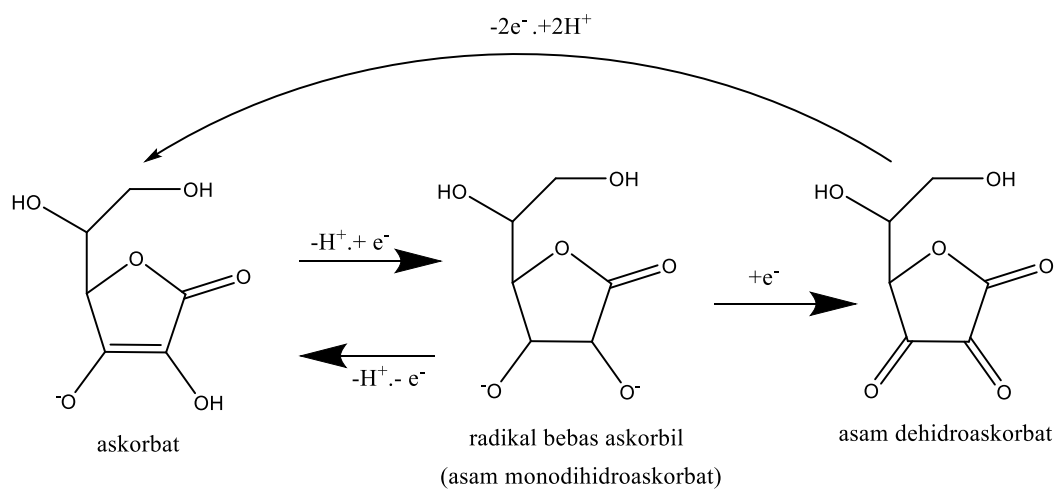
Vitamin adalah salah satu komponen yang memiliki peran penting untuk menjaga kelangsungan hidup. Terdapat dua kelompok vitamin yaitu vitamin yang larut dalam lemak (A, D, E, dan K) dan vitamin larut dalam air (B dan C) (Rohman & Sumantri, 2007). Vitamin C (asam askorbat) salah satu vitamin yang ditemukan di beberapa makanan. Vitamin C mempunyai peran sebagai antioksidan dan membantu melindungi kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas (NIH, 2019)



Gambar 2. 1 Struktur Vitamin C

Sumber: Farmakope Indonesia Edisi VI

Nama kimia untuk Vitamin C (asam L-askorbat) adalah 2,3-didehydro-L-threo-hexano-1,4-lakton. L-askorbat adalah bentuk alami dan aktif secara biologis (Taylor & Francis, 2002). Sebelum disebut Vitamin C atau asam l-askorbat atau asam askorbat ternyata mempunyai nama lain yaitu asam heksuronat dan bentuk teroksidasi dari senyawa tersebut adalah asam dehidroaskorbat (Combs, 2012).



Gambar 2. 2 Reaksi oksidasi Vitamin C

Sumber: (Combs, 2012)

Vitamin C teroksidasi secara *in vivo* dengan pelepasan dua elektron tunggal disebut sebagai oksidasi monovalen pertama membentuk *ascorbyl free radical* (monodihydroascorbic acid) yang bersifat *reversible* (dalam dua arah) dengan Vitamin C, kemudian dapat teroksidasi kembali membentuk *dehydroascorbic acid* yang bersifat *irreversible* dan dari bentuk *dehydroascorbic acid* bersifat *reversible* dengan Vitamin C. *Dehydroascorbic acid* mudah terhidrolisis menjadi 2,3-diketogulonic acid, dimana tidak ada aktivitas Vitamin C.

2.1.1 Sifat Fisika Dan Kimia Vitamin C

Menurut Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Vitamin C adalah vitamin yang secara alami ada dalam makanan dan Vitamin C mudah larut dalam air. Vitamin C tidak dapat di produksi atau di simpan oleh manusia sehingga harus diperoleh dari makanan seperti buah-buahan atau sayuran (Badan POM, 2020) (NCBI, 2022).

Vitamin C juga mudah teroksidasi. Teroksidasinya Vitamin C bisa dipercepat oleh peningkatan suhu, sinar, enzim, oksidastor dan katalis logam (tembaga dan besi) (Sari et al., 2022)

Tabel 2. 1 Sifat Fisika Kimia Vitamin C

Rumus Vitamin C	C ₆ H ₈ O ₆
BM (Berat Molekul)	176,12
Kadar Vitamin C	>99,0% - <100,5%
Pemerian	- Hablur atau serbuk putih atau agak kuning. Adanya pengaruh cahaya menyebabkan warna Vitamin C menjadi gelap. - Stabil di udara apabila dalam suasana kering - Cepat teroksidasi jika dalam larutan - Melebur pada suhu lebih kurang 190°C
Kelarutan	- Mudah larut dalam air - Agak sukar larut dalam etanol - Tidak larut dalam kloroform, eter, dan benzene.
Penyimpanan	- Dalam wadah tertutup rapat dan terlindungi dari cahaya
Wadah dan penyimpanan	- Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya.

Sumber: (*Farmakope Indonesia Edisi VI*, 2020)

2.1.2 Fungsi Vitamin C

Vitamin C memiliki fungsi sebagai antioksidan yang berperan melindungi dan mencegah sel-sel tubuh dari paparan radikal bebas yang menimbulkan berbagai macam penyakit. Fungsi lain dari Vitamin C antara lain sebagai sintesis kolagen, karnitin, noradrenalin, serotonin, dan metabolisme zat besi, absorpsi kalsium, mencegah infeksi, dan mencegah penyakit jantung (Rahayu et al., 2019) (Yankes Kemenkes RI, 2022).

Antioksidan dapat mencegah kerusakan tulang dengan menghancurkan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan pada jaringan. Vitamin C dapat menyembuhkan sariawan di mulut biasanya dengan mengonsumsi buah jeruk, meringankan gejala flu atau pilek (Hoffman & Metcalf, 2015). Penggunaan Vitamin C banyak dijumpai dalam bentuk suplemen makanan, antimikroba dan antioksidan dalam bahan makanan, penyedap rasa, dapat digunakan sebagai bahan inert dalam produk pestisida, dan sebagai produk kosmetik salah satunya tabir surya (NCBI, 2022).

2.1.3 Kebutuhan Vitamin C

Sumber Vitamin C biasanya didapatkan dari bahan pangan nabati yaitu buah-buahan dan sayuran seperti jeruk, nanas, rambutan, pepaya, gandaria, tomat serta sayuran daun-daunan berwarna hijau sampai jenis kol bunga (Rahayu et al., 2019)

Manusia membutuhkan asupan Vitamin C dalam tubuhnya, tetapi kebutuhan tersebut berbeda-beda untuk setiap orang. Hal tersebut disesuaikan dengan faktor usia, jenis kelamin, dan situasinya, dengan catatan bagi seseorang yang merokok perlu menambahkan 35 mg dari total kebutuhan harian Vitamin C yang disarankan (NIH, 2019)

Tabel 2. 2 Vitamin C yang dibutuhkan tubuh manusia

Tahap kehidupan	Jumlah yang direkomendasikan
Lahir sampai 6 bulan	40 mg
Bayi 7-12 bulan	40 mg
Anak-anak 1-3 tahun	0,9 mg
Anak-anak 4-8 tahun	0,3 mg
Anak-anak 9-13 tahun	12,2 mg
Remaja 14-18 tahun (anak laki-laki)	2,4 mg
Remaja 14-18 tahun (perempuan)	0,6 mg
Dewasa (pria)	14 mg
Dewasa (Wanita)	28 mg
Remaja yang sedang hamil	1,1 mg
Wanita hamil	10 mg
Menyusui remaja	52,8 mg
Wanita menyusui	0,0 mg

Sumber: (NIH, 2019)

2.2. Buah-buahan Mengandung Vitamin C

2.1.4 Buah Jambu Biji

Menurut data Badan Pusat Statistik tahun 2021 produksi tanaman buah-buahan jambu biji (*Psidium guajava*) di Indonesia sebanyak 422.491 juta buah sedangkan di Jawa Barat 69.249 juta buah. Jambu biji salah satu buah yang mempunyai potensi besar untuk dikembangkan dalam memenuhi gizi karena kandungan Vitamin C dalam jambu biji lebih tinggi dibandingkan dengan jeruk manis yaitu 87 mg dalam 100 gram (Parimin, 2005)

a. Klasifikasi



Gambar 2. 3 Buah Jambu Biji Merah

Sumber: <https://dinpertanpangan.demakkab.go.id/?p=2608>

Tanaman Jambu Biji termasuk ke dalam klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub kingdom	: Tracheobionta
Super divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub kelas	: Rosidae
Ordo	: Myrtales
Famili	: Myrtaceae Juss
Genus	: <i>Psidium L</i>
Spesies	: <i>Psidium guajava L</i> (USDA, 2023)

b. Morfologi

Tumbuhan jambu biji merah dengan batang berwarna coklat, bercabang, dan berkayu, tekstur batang yang licin, daunnya tunggal dan berwarna hijau, ujung tumpul, pangkalnya membuat, tepi rata berhadapan, daun berwarna hijau kekuningan dengan pertulangan daunnya menyirip. Buahnya berbentuk bulat telur, dagingnya bewarna merah dengan biji kecil-kecil, buahnya keras (He & Venant, 2004)

c. Komposisi

Tabel 2. 3 Komposisi Zat Gizi Buah Jambu Biji per 100 gram

Komposisi zat gizi	JumLah	Satuan
Air	86	g
Energi	49	Kal
Protein	0,9	g
Lemak	0,3	g
KH	12,2	g
Serat	2,4	g
Abu	0,6	g
Kalsium	14	mg
Fosfor	28	mg
Besi	1,1	mg
Natrium	10	mg
Kalium	52,8	mg
Tembaga	0,0	mg
Seng	0,3	mg
Retinol	-	mg
B-Kar	27	mcg

Kar-total	25,0	mcg
Thiamine	0,02	mcg
Riboflavin	0,03	mg
Niasin	0,8	mg
Vitamin C	87	mg
BDD	82	%

Sumber: (Direktorat Gizi Kemenkes RI, 2018)

2.1.5 Buah Kiwi

Buah kiwi (*Actinidia deliciosa*) di luar Cina menyebutkan buah tersebut hasil para ahli botani Eropa yang berpetualang di Cina pada dutahun 1700-an dan 1800-an. Para penjelajah tersebut antara lain ahli botani Skotlandia Robert Fortune. (Ward & Courtney, 2013)

a. Klasifikasi



Gambar 2. 4 Buah Kiwi

Sumber: dokumentasi pribadi

Tanaman Kiwi termasuk ke dalam klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Ericales
Famili	: Actinidiaceae
Genus	: Actinidia
Spesies	: <i>Actinidia deliciosa</i> (Zamzami & Hanif, 2019)

b. Morfologi

Buah kiwi berbentuk oval (5-8 cm dengan diameter 4,5-5,5 cm) atau seperti sawo, kulitnya berwarna coklat dan berambut, daging buah berwarna hijau teksturnya lembut dengan biji berwarna hitam yang dapat langsung dikonsumsi, tetapi rasa dan aroma kiwi

kuning berbeda dengan kiwi hijau yaitu kiwi kuning lebih beraroma dan rasanya lebih manis (Zamzami & Hanif, 2019).

c. Komposisi

Tabel 2. 4 Komposisi Zat Gizi Buah Kiwi per 100 gram

Komposisi zat gizi	JumLah	Satuan
Energi	306	Kj
Protein	1	g
Karbohidrat	15	g
Glukosa	3,5	g
Vitamin C	100	mg
Vitamin E	1,1	mg
Folat	30	pg
Kalium	231	mg
Kalsium	26	mg
Zat besi	0,4	mg
Zinc	0,1	mg
Indeks glikemik	39	Pg/g

Sumber: (Angraini & Luqman, 2017)

Buah kiwi yang ada di Indonesia merupakan kiwi berwarna hijau. dan kaya kandungan nutrisi seperti Vitamin C, Vitamin K, Vitamin E, asam folat dan kalium. Kandungan antioksidan banyak dan merupakan sumber serat yang baik (Yankes Kemenkes RI, 2022).

2.1.6 Buah Lemon

Lemon berasal dari pohon cemara kecil yang ada di Asia dan buahnya berbentuk oval berwarna kuning. Buah tersebut dapat digunakan untuk tujuan kuliner dan non-kuliner. Bagian daging lemon dikonsumsi sebagai jus dan kulitnya sebagai bahan tambahan masakan. Kandungan lemon dapat mengatasi masalah pencernaan seperti konstipasi, menurunkan berat badan, perawatan kulit, perawatan mata, penyakit kudis, mengurangi peradangan di tenggorokan (Hoffman & Metcalf, 2015) (Mohanapriya et al., 2013)

a. Klasifikasi



Gambar 2. 5 Buah Lemon

Sumber: dokumentasi pribadi

Tanaman Lemon termasuk ke dalam klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub kingdom	: Tracheobionta
Super divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub kelas	: Rosidae
Ordo	: Sapindales
Famili	: Rutaceae Juss
Genus	: <i>Citrus L</i>
Spesies	: <i>Citrus limon</i> (USDA, 2023)

b. Morfologi

Buah jeruk lemon tekstur kulitnya kasar, berwarna kuning, berbentuk bulat seperti telur panjang 5 - 8 cm dengan kedua ujung yang runcing, ketebalan kulitnya 0,5 - 0,7 cm, berbiji kecil dengan bentuk ovoid, permukaan bijinya halus (Nurlaely, 2016).

c. Kandungan

Tabel 2. 5 Komposisi Zat Gizi Buah Lemon per 100 gram

Komposisi zat gizi	JumLah	Satuan
Air	92,2	g
Energi	34	kal
Protein	0,5	g
Lemak	0,8	g
KH	6,2	g
Serat	0,1	g
Abu	0,3	g
Kalsium	23	mg
Fosfor	20	mg
Besi	0,3	mg
Natrium	31	mg
Kalium	140,0	mg
Tembaga	0,1	mg
Seng	0,2	mg
Retinol	-	mg
B-Kar	0	mcg
Thiamine	0,09	mcg
Riboflavin	0,12	mg
Niasin	0,3	mg
Vitamin C	50	mg
BDD	100	%

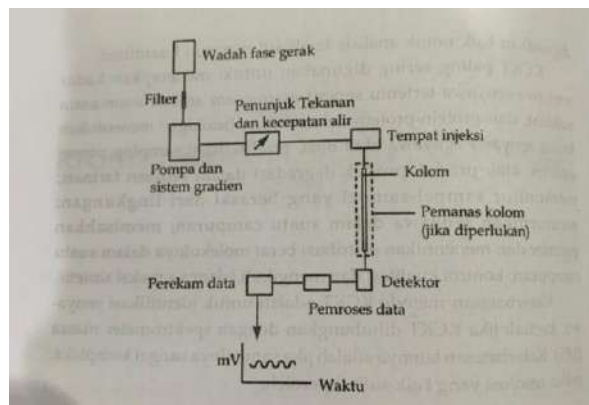
Sumber: (Direktorat Gizi Kemenkes RI, 2018)

2.3. Infused water

Infused water merupakan jenis minuman yang memberikan kombinasi unik rasa buah dengan menempatkan seluruh potongan buah ke dalam rendaman air. *Infused water* menjadi air minum unik yang muncul dalam dunia kesehatan. Masyarakat menyadari bahwa manfaat minum air jauh lebih besar dari pada kerugiannya apabila tidak cukup minum air. *Infused water* dikonsumsi dari berbagai kalangan tidak hanya dari ahli gizi, selebriti, tetapi juga dari kalangan biasa yang peduli terhadap kesehatan mereka. Komposisi yang biasa dikonsumsi oleh kebanyakan orang seperti buah jeruk, lemon, jeruk bali merah karena memiliki rasa yang tajam serta untuk buah stroberi dan anggur memiliki rasa yang manis (Peters, 2015).

Beberapa manfaat dari mengonsumsi *infused water* yaitu jenis minuman alami tanpa kalori karena dibuat tanpa menambahkan gula sebagai pemanis. Oleh karena itu, meminum *infused water* tidak akan menaikkan berat badan. *Infused water* sebagai detoksifikasi, dimana racun yang dikeluarkan oleh tubuh tidak akan menimbulkan jerawat karena air dapat membantu membuat kulit menjadi bersih dan bercahaya. Mengonsumsi *Infused water* tidak hanya membantu meningkatkan energi dalam tubuh, tetapi dapat membantu meningkatkan suasana hati (Peters, 2015).

2.4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)



Gambar 2. 6 Sistem KCKT

Sumber: (I. G. Gandjar, 2007)

KCKT adalah teknik pemisahan secara fisik yang dilakukan dalam fase cairan, dimana sampel dipisahkan menjadi komponen analit dan komponen lain (matriksnya). Komponen analit akan diantarkan oleh fase gerak (cairan yang mengalir) dan komponen yang tidak terantarkan tertahan dalam fase diam (dalam kolom). KCKT dihubungkan dengan detektor untuk memantau setiap komponen yang terpisah kemudian menghasilkan sebuah kromatogram. KCKT merupakan teknik analisis yang paling banyak digunakan untuk analisis kuantitatif farmasi, biomolekul, polimer, dan senyawa organik lainnya (Ahuja & Dong, 2005)

KCKT dapat digunakan dalam industri farmasi untuk menguji berbagai jenis sampel. Beberapa pilihan metode yang digunakan yaitu untuk memeriksa kemurnian kandidat obat baru, memantau uji sampel atau peningkatan prosedur sintetik, proses pengujian terhadap pengembangan obat baru, dan dapat mengatur kualitas atau pun jaminan produk akhir obat (Ahuja & Dong, 2005). Penemuan dan pengembangan obat baru bertujuan untuk menentukan sejumlah besar senyawa yang dapat digunakan dengan pendekatan skrining cepat, pembentukan senyawa, lalu mempersempit seleksi melalui sistesis yang ditargetkan dan skrining selektif, dimana mengarah pada pemilihan kandidat obat yang berpotensi memiliki potensial ke depan untuk pengembangan obat (Kazakevich & Lobrutto, 2007)

Tujuan dilakukannya analisis KCKT untuk memisahkan lebih dari satu komponen dalam suatu sediaan dimana antara komponen yang dianalisis dengan komponen lainnya (matriks) secara akurat. Beberapa hal yang perlu diperhatikan untuk analisis menggunakan KCKT, pertama kelarutan sampel, dimana sampel haruslah larut karena masalah kelarutan memperumit saat pengujian sampel dilakukan apabila kelarutan rendah dan formulasi pelepasan kontrol, kedua pemisahan, pemisahan komponen tidak dapat terjadi jika tidak ada interaksi dengan fase diam, ketiga fase gerak, dimana fase gerak mengatur pemisahan secara keseluruhan pada KCKT sedangkan fase diam memberikan retensi dan mempengaruhi mekanisme pemisahan, keempat larutan analit akhir yang dianalisis harus disiapkan dalam fase gerak artinya larutan analit jika memungkinkan dilarutkan dengan pelarut yang kekuatannya lebih lemah dari pada fase gerak yang digunakan sebelumnya hal tersebut dilakukan untuk mengantisipasi kromatogram menghasilkan *splitting peaks* atau *fronting peaks* yang disebabkan oleh injeksi larutan analit dengan pelarut dengan kekuatan yang kuat (Ahuja & Dong, 2005)

Alat KCKT terdiri dari beberapa bagian yaitu *reservoir*, pompa, injektor, kolom, dan detektor

1. Wadah fase gerak (*Reservoir*)

Wadah fase gerak (*reservoir*) biasanya berbentuk labu lab atau cukup dengan wadah pelarut kosong. Wadah tersebut berfungsi untuk menampung pelarut fase gerak yang akan digunakan dengan ukuran 1-2 liter. Sebelum menggunakan fase gerak pada instrumen terlebih dahulu dilakukan *degassing* yang bertujuan untuk menghilangkan gas dalam pelarut karena apabila gas terkumpul dalam pompa dan detektor dapat menyebabkan hasil analisis tidak akurat (I. G. Gandjar, 2007).

Pelarut yang digunakan dalam fase gerak dianjurkan menggunakan kemurnian yang sangat tinggi dan apabila menggunakan KCKT maka pelarut tersebut harus berderajat KCKT (HPLC grade). Jenis pelarut tersebut bisa berupa larutan, buffer, ataupun reagen. Setelah dilakukan *degassing* pada fase gerak lalu disaring terlebih dahulu untuk menghilangkan partikel-partikel kecil atau pengotor. Adanya pengotor dapat menyebabkan gangguan pada sistem kromatografi yang disebabkan terkumpulnya partikel dapat menyumbat saluran pada selang pompa sehingga pompa mengalami kekosongan (I. G. Gandjar, 2007).

2. Pompa

Penggunaan pompa bertujuan menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduksibel, konstan, dan bebas dari gangguan. Terdapat 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu tekanan konstan dan aliran fase gerak yang konstan, fase ini lebih umum digunakan dibandingkan dengan pompa tekanan konstan. Syarat pompa pada KCKT sama halnya dengan syarat wadah pelarut yaitu keadaan inert terhadap fase gerak (I. G. Gandjar, 2007).

Pompa membantu mengalirkan fase gerak ke dalam kolom dengan kecepatan alir 3 mL/menit dengan tekanan pada pompa 5000 psi, tetapi jika pompa ditujukan untuk preparatif maka perlu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit. Bahan yang digunakan untuk pompa yaitu gelas, baja tahan karat, dan teflon (I. G. Gandjar, 2007).

3. Injektor

Injektor merupakan tempat penyuntikan untuk memasukkan larutan atau sampel cair dengan cara disuntikan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom. Alat penyuntik tersebut terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal dan eksternal (I. G. Gandjar, 2007)

Pada saat menginjeksikan sampel, sampel akan mengalir dengan banyak melewati keluk sampel dan sisa lebihnya dikeluarkan ke arah limbah. Pada saat penyuntikan katup diputar untuk membuat fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan mengalirkan sampel ke kolom. Penyuntikan ini mudah dilakukan apabila digunakan pada KCKT otomatisasi atau *autosampler* (I. G. Gandjar, 2007).

4. Kolom

Terdapat 2 jenis kolom pada KCKT yaitu kolom konvensional dan mikrobor. Perbandingan antara kedua kolom tersebut sebagai berikut

Tabel 2. 6 Perbandingan kolom konvensional dan mikrobor

Parameter	Kolom konvensional	Kolom mikrobor
Tabung kolom	Bahan stainless steel Ukuran panjang 3,10,15, 20, dan 25 cm Diameter luar 0,25 inci Diameter dalam 4,6 mm	Bahan stainless steel Ukuran panjang 25 dan 50 cm Diameter luar 0,25 inci Diameter dalam 1 atau 2 mm
Kinerja	Berkurangnya ukuran partikel fase diam menyebabkan efisiensi meningkat, tetapi umur kolom lebih pendek apabila menggunakan ukuran partikel 3 um	Sangat efisien dan sensitif, tetapi lebih lambat. Penggunaan fase gerak hanya ¼ dari kolom konvensional
Tekanan operasional	500 – 3000 psi (35 – 215 bar)	1000 – 5000 psi (70 – 350 bar)
Fase diam	- Porous - Ukuran silika kecil - Silika yang dimodifikasi kimiawi (bonded phase), atau polimer-polimer stiren/divinil benzene - Rata-rata diameter partikel 3,5 atau 10 um dengan kisaran yang sempit	
Fase gerak	- Fase normal: Hidrokarbon + pelarut-pelarut terklorinasi atau alkohol - Fase terbalik: metanol atau asetonitril + air atau buffer - Laju alir: 1-3 mL/menit	- Fase normal: Hidrokarbon + pelarut-pelarut terklorinasi atau alkohol - Fase terbalik: metanol atau asetonitril + air atau buffer - Laju alir: 10-100 uL/menit - Modifikasi instrument: system penghantaran pelarut yang memberikan kontrol laju <10uL/menit - Katup injeksi sampel bervolume kecil - Sel detektor bervolume kecil

Sumber: (I. G. Gandjar, 2007)

Dalam praktiknya kolom konvensional memiliki keuntungan untuk analisis rutin walaupun kolom konvensional tidak setahan kolom mikrobor.

5. Detektor

Detektor dalam KCKT terdapat 2 kelompok yaitu universal dan spesifik. Detektor universal dapat mendeteksi zat secara umum, tidak spesifik, dan tidak selektif contohnya

detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa sedangkan detektor spesifik hanya mendeteksi analit tertentu secara spesifik dan selektif contohnya detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia (I. G. Gandjar, 2007).

Karakteristik suatu detektor yang ideal yaitu

- Memiliki respon yang cepat dan reproduibel terhadap solute
- Memiliki sensitifitas yang tinggi agar dapat mendeteksi solute dengan kadar yang sangat kecil
- Stabil dalam pengoperasiannya
- Memiliki sel volume yang kecil sehingga dapat meminimalkan pelebaran pita
- Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solute pada kisaran yang luas (kisaran dinamis linier)
- Tidak terpengaruh oleh perubahan suhu dan laju alir dari fase gerak

Detektor Spektrofotometri UV-Vis

Jenis detektor ini adalah detektor yang paling sering digunakan pada analisis di bidang farmasi karena sangat berguna untuk menganalisis obat, dimana kebanyakan senyawa obat tersebut mempunyai struktur yang dapat menyerap sinar UV-Vis (I. G. Gandjar, 2007)

Penyerapan radiasi detektor UV-Vis didasari pada dua hal yaitu penyerapan sinar ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Vis) dengan rentang panjang gelombang 190-800 nm oleh spesies solute yang mempunyai struktur-struktur atau gugus kromoforik. Sel detektor umumnya berupa tabung dengan diameter 1 mm dan panjang celah optiknya 10 mm dan diatur sedekimian rupa sehingga dapat menghilangkan pengaruh indeks bias yang mampu mengubah absorbansi yang terukur (I. G. Gandjar, 2007)

Panjang gelombang detektor spektrofotometri UV-Vis dapat diatur secara tetap ataupun beragam. Pada detektor panjang gelombang tetap menggunakan lampu uap merkuri sebagai sumber energinya dan suatu filter optis yang mana dapat memilih sejumlah panjang gelombang tertentu dimisalkan 254, 280, 334, dan 436 nm. Pada panjang gelombang 254 nm sangat berguna karena kebanyakan senyawa obat menyerap di 254 nm (I. G. Gandjar, 2007)

Sedangkan detektor dengan panjang gelombang yang bervariasi lebih banyak digunakan dibandingkan dengan detektor pada panjang gelombang yang tetap karena seorang analis lebih leluasa untuk dapat memilih panjang gelombang yang memberikan sensitifitas yang paling tinggi (I. G. Gandjar, 2007)

Karakteristik detektor spektrofotometri UV-Vis pada KCKT memiliki sensitifitas yang bagus, sering digunakan, selektif terhadap gugus-gugus dan stuktur-struktur yang tidak jenuh (I. G. Gandjar, 2007)

Pemisahan dalam KCKT dikelompokkan menjadi fase normal dan fase terbalik. Untuk menentukan hal tersebut dilihat dari kepolaran yang digunakan pada fase gerak dan fase diam (I. G. Gandjar, 2007)

1. Fase gerak

Fase gerak disebut juga eluen merupakan campuran pelarut yang berperan dalam elusi dan resolusi. Elusi dan resolusi ditentukan oleh polaritas pelarut dan fase diam beserta sifat dari komponen sampel (I. G. Gandjar, 2007).

Pemisahan fase normal menggunakan fase diam sifatnya lebih polar dari pada fase gerak (fase diam polar, fase gerak non polar), semakin tinggi polaritas pelarut maka semakin tinggi juga kemampuan elusinya. Pemisahan fase terbalik menggunakan fase gerak berupa campuran larutan buffer dengan metanol atau pun campuran air dengan asetonitril sedangkan pemisahan fase normal fase gerak yang sering digunakan berupa campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan pelarut-pelarut jenis alkohol. Pemisahan fase terbalik lebih umum digunakan dibandingkan dengan fase normal (I. G. Gandjar, 2007).

Elusi bisa dilakukan dengan dua cara yaitu isokratik dan gradien. Isokratik yaitu komposisi fase gerak yang digunakan dari awal sampai akhir sama sedangkan gradien yaitu komposisi fase gerak dari awal sampai akhir berbeda, penggunaan elusi gradien jika sampel mempunyai polaritas yang luas dan digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks (I. G. Gandjar, 2007).

2. Fase diam

Fase diam pada KCKT kebanyakan berupa silika dapat dimodifikasi secara kimiawi. Adapun silika yang tidak dimodifikasi atau polimer-polimer stiren dan divinil benzene. Permukaan silika bersifat polar dan sedikit asam dikarenakan adanya residu gugus silanol (Si-OH). Silika yang dapat dimodifikasi secara kimiawi menggunakan reagen seperti klorosilan. Karakter silika yang dimodifikasi berbeda dengan silika tidak dimodifikasi yaitu mempunyai kromatografik dan selektifitas yang berbeda.(I. G. Gandjar, 2007)

Fase diam yang paling banyak digunakan adalah Oktadesil Silika (ODS/C18) karena dapat memisahkan senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran yang rendah hingga tingkat tinggi. Silika yang tidak dimodifikasi dapat digantikan

dengan silika-silika aminopropyl dan sianopropil. Silika yang tidak dimodifikasi akan memberikan waktu retensi yang bervariasi disebabkan adanya kandungan air yang digunakan. Pada penggunaan fase diam silika fase terikat solute-solute yang pola terutama bersifat basa memberikan gambaran puncak yang mengekor (*tailing peak*). *Tailing peak* dapat terjadi dikarenakan adanya interaksi adsorpsi antara solute-solute dengan residu silanol dan pengotor logam yang terdapat pada silika (fase diam). Hal tersebut dapat diatasi dengan *end-capping* yaitu proses menutup residu silanol dengan gugus-gugus trimetilsiklik, menggunakan silika dengan kemurnian yang tinggi dengan kandungan logam < 1 bpj (I. G. Gandjar, 2007)

2.5. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah proses yang digunakan untuk menetapkan suatu sistem melalui studi laboratorium dimana karakteristik kinerja prosedur memenuhi persyaratan untuk aplikasi analitik yang ditetapkan (USP, 2013)

1. Spesifisitas

Spesifisitas adalah komponen dari kesalahan total dan ketidakmampuan seseorang untuk mendeteksi atau membedakan gangguan yang menyebabkan peningkatan bias dalam analisis. Kemampuan untuk menggambarkan pemisahan yang memadai dari analit diukur dengan menggunakan pendekatan yang berbeda yaitu tergantung pada teknik analisis, bahan yang diukur, dan ukuran pengganggu. Terlepas dari teknik analisis yang dipilih penting bagi pengukuran harus dikaitkan dengan tingkat kesalahan yang dapat diterima untuk pengukuran yang akan dianalisis (Wiley, 2015).

2. Linieritas

Linieritas dalam prosedur analitis adalah kemampuan untuk memperoleh hasil secara langsung atau dengan transformasi matematis yang terdefinisi dengan baik, sebanding dengan konsentrasi analit dalam sampel dengan rentang tertentu. Linieritas yaitu hubungan antara konsentrasi dengan pengukuran uji dengan catatan pengukuran analisis disesuaikan dengan metode yang digunakan. Rentang dinyatakan dalam satuan yang sama dengan hasil pengujian misalnya persen atau bagian per sejuta (bpj) yang diperoleh dari prosedur analitis (USP, 2013)

Penentuan linieritas dan rentang perlu dilakukan untuk melihat ada hubungan linier, jika ada hubungan antar keduanya perlu dilakukan metode statistik yang sesuai misalnya perhitungan regresi linier. Untuk mendapatkan persamaan regresi linier dibuat dari kurva kalibrasi, dimana terdapat hubungan antara nilai absorbansi terukur (sumbu y)

dan kadar larutan standar (sumbu x), lalu didapatkan juga nilai koefisien korelasi (r^2) (USP, 2013 dan Dwi Harmono, 2020)

3. Sensitifitas

a. Batas Deteksi (BD)

Batas Deteksi (BD) disebut juga *Limit of Detection* (LOD) adalah salah satu parameter validasi untuk mengetahui kadar terkecil analit dalam sampel yang masih dapat terdeteksi dan dapat memberikan respon yang berbeda dengan blanko ataupun noise. Pada batas deteksi kadar analit memberikan respon tiga kali simpangan baku pengukuran blanko dan perhitungan BD dinyatakan dengan persamaan $3,3 \text{ SD}/b$. SD adalah standar deviasi yaitu nilai absorbansi dari hasil pengukuran dan b adalah slope didapatkan dari persamaan kurva kalibrasi (Dwi Harmono, 2020).

b. Batas Kuantitasi (BK)

Batas Kuantitasi (BK) atau di kenal juga *Limit of Quantitation* (LOQ) merupakan konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang memenuhi kriteria dengan akurat dan seksama. Batas kuantitasi dapat menunjukkan sensitivitas pada metode analisis yang digunakan. Pada batas kuantitasi kadar analit memberikan respon sepuluh kali simpangan baku pengukuran blanko dan dihitung dengan persamaan $10 \text{ SD}/b$ (Dwi Harmono, 2020).

4. Uji Perolehan Kembali

a. Akurasi

Akurasi (ketepatan) adalah parameter yang menjukkan hubungan antara hasil analisis (*measured value*) dengan jumlah analit yang sebenarnya (*accepted true value*) yang umumnya ditunjukkan dengan persen perolehan kembali (*% recovery*). Nilai suatu akurasi dinyatakan baik apabila nilai perolehan kembalinya masih dalam rentang yang ditentukan (Dwi Harmono, 2020).

b. Presisi

Presisi adalah salah satu parameter terpenting yang diperlukan untuk menunjukkan bahwa suatu prosedur akan memberikan hasil yang valid. Istilah yang sering dikaitkan dengan presisi yaitu keterulangan (*repeatabily*), presisi menengah (*intermediate precision*), dan reproduktifitas (*reproducibility*). Presisi diukur menggunakan perhitungan standar deviasi (SD) atau simpangan baku relatif (*% SBR*). (Wiley, 2015)

5. Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

Sebelum dilakukan analisis perlu untuk memastikan bahwa sistem dan prosedur yang digunakan mampu memberikan data yang valid. Hal tersebut dengan dilakukan percobaan kesesuaian sistem sebagai serangkaian uji untuk menjadi bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Uji kesesuaian sistem dilakukan setelah pengembangan metode analisis dan validasi metode analisis (I. G. Gandjar, 2007)

2.6. Analisis Kadar Vitamin C

Analisis kadar Vitamin C dapat dilakukan dengan analisis kualitatif dan kuantitatif. analisis kualitatif untuk mengidentifikasi adanya Vitamin C dalam sampel sedangkan analisis kuantitatif untuk menentukan kadar Vitamin C dalam sampel secara pasti. Salah satu metode analisis kuantitatif yaitu Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), berikut beberapa penelitian untuk analisis kadar Vitamin C menggunakan KCKT.

Tabel 2. 7 Penelitian Analisis Kadar Vitamin C

Sampel	Detektor, Panjang Gelombang	Fase Diam	Fase Gerak	Laju Alir	Volume Injeksi (μ l)	Kadar Vitamin C	Daftar Pustaka
Jus jeruk peras segar	UV, 245 nm	C18	Etanol 96%	0.8 mL/menit	10	52,9057 mg/100 g	(Ismillayli et al., 2020)
Cabe rawit	UV, 264 nm	C18	Asam asetat 0,1% : metanol 0,1% (95:5) v/v	$\pm$ 1 mL/menit	20	0,2385 mg/50 mg	(Jubahar et al., 2015)
Ekstrak bongol nanas	UV, 254 nm	C18	Ammonium fosfat 0.01 mol/L : Asam ortofosfat 0,1% (80:20)	1 mL/menit	20	68,563 mg/100 g	(Rusli et al., 2022)
Ekstrak paprika	UV, 264 nm	C18	Metanol : aquabidest (15:85)	1 mL/menit	20	2,05, 4,1305, 1,2153 mg/10 mg	(Sanuddin et al., 2021)