

## Determination of Ascorbic Acid Content Using The Reverse Phase–High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) Method

Nurul Ismillayli<sup>1\*</sup>, Dhony Hermanto<sup>1,2</sup>, I. G. A. Sri Andayani<sup>2</sup>, Ruru Honiar<sup>2</sup>,  
Ulul Khairi Zuryati<sup>2</sup>, Baiq Mariana<sup>2</sup>, Linda Marta Shofiyan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram; Mataram–NTB

<sup>2</sup>Laboratorium Kimia Analitik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram; Mataram–NTB

\*Corresponding Author: [nurul.ismillayli@unram.ac.id](mailto:nurul.ismillayli@unram.ac.id)

Received: August,18,2020 /Accepted: December,27,2020  
Doi: 10.24252/al-kimiav8i2.15097

**Abstract:** Determination of ascorbic acid content using reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was conducted. In this study, analytical performance of method was evaluated, including limit of detection, precision, accuracy and recovery. The determination was conducted at optimum conditions for RP-HPLC method, including ethanol as mobile phase, flow velocity of 0.8 mL/min, running time of 5 minutes, injection volume of 10  $\mu$ L, UV detector, wavelength of 245 nm with internal standard of ascorbic acid in metaphosphate-acetic acid. Result of measurement was compared with standart methode, namely titration using dichlorophenol indophenol (DCPIP) as indicator in determining the end point of the titration. It was obtained that RP-HPLC method was high sensitive and precision method due to the low limit of detection and RSD, 0,5  $\mu$ g/mL and RSD  $\leq$  2%, respectively. The percentage of recovery obtained is excellent in the range of 97.9-104.3%. The results of the determination of vitamin C content in fresh squeezed orange juice using RP-HPLC method and the titrimetry method was, 52.9057  $\pm$  0.17 and 54.2066  $\pm$  0.87 mg in 100 g sample, respectively. Based on statistical analysis (t-test), there were no significant differences for the two methods used. Therefore, the RP-HPLC method is expected to be an accurate method for routine analysis of vitamin C.

**Keywords:** Ascorbic acid, reverse phase, HPLC, titrimetric.

### PENDAHULUAN

Vitamin C, asam askorbat adalah vitamin yang larut dalam air yang dapat ditemukan di banyak sistem biologis dan bahan makanan (sayuran dan buah-buahan segar). Asam askorbat berperan penting dalam biosintesis kolagen, penyerapan besi, dan aktivasi respons imun dan terlibat dalam penyembuhan luka dan osteogenesis. Asam askorbat juga bertindak sebagai antioksidan kuat yang melawan penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas (Tu, Njus, & Schlegel, 2017). Namun demikian, kelebihan asam askorbat dapat menyebabkan iritasi lambung, dan produk metabolisme vitamin C (asam oksalat) dapat menyebabkan masalah ginjal (Grosso et al., 2013). Kekurangan vitamin C pada manusia menyebabkan penyakit yang disebut *scurvey* (Du, Cullen, & Buettner, 2012), yang gejalanya meliputi pendarahan, nyeri sendi, dan kelelahan (Zuo, Zhou, Zuo, & Deng, 2015). Tubuh manusia tidak dapat menghasilkan asam askorbat, dan karenanya harus diperoleh sepenuhnya melalui diet seseorang meskipun asupan vitamin C harian seseorang sangat kecil. Asam askorbat adalah zat yang labil, karena mudah terdegradasi oleh enzim dan oksigen (Asmara & Amungkasi, 2019). Oksidasi dapat dipercepat oleh panas, cahaya, dan logam berat yang berlebihan. Itulah sebabnya

kandungan asam askorbat dari bahan makanan dan minuman merupakan indikator kualitas yang harus dipantau secara hati-hati, terutama selama proses pembuatan dan penyimpanan. Banyak metode analitik dapat digunakan untuk penentuan asam askorbat.

Teknik klasik (konvensional) diwakili oleh metode volumetrik/titrasi dengan larutan oksidan seperti *dichlorophenol indophenol* (DCPIP) (Dinesh, Yadav, Reddy, Padma, & Sukumaran, 2015), potasium iodat (Al Majidi & Y-AIQubury, 2016), atau potasium bromat (*back redox titration*) (Sharaa & Mussa, 2019). Kekurangan dari teknik volumetrik adalah rendahnya spesivitas sehingga penggunaannya terbatas pada sampel yang tidak mengandung agen pereduksi lainnya. Metode instrumentasi yang banyak digunakan dalam penentuan kadar asam askorbat di berbagai laboratorium analis adalah spektrofotometri, hal ini berdasarkan oksidasi asam askorbat menjadi asam dehidroaskorbat. Pengukuran spektroskopi dilakukan menggunakan kompleks Cu(II)-neokuproin yang direduksi menjadi Cu(I)-bis(neokuproin) dan absorbansi ditentukan pada panjang gelombang maksimum 450 nm (Guglu, Sozgen, Tutem, Ozyurek, & Aspak, 2005). Selain itu, reagen iodium juga dapat digunakan paa penentuan kandungan asam askorbat secara spektrofotometri. Kelemahan dari pengukuran secara spektroskopi berdasarkan redoks adalah adanya interferen seperti logam yang akan mengganggu kesetimbangan redoks dalam sistem pengukuran. Metode optik lainnya dapat digunakan adalah fotometri (Firdous, Naveed, Karpagam, Karthi, & Subashini, 2011), fluorescence (Matsuoka, Yamato, & Yamada, 2016) dan *chemiluminescence* (Hasanin & Fujiwara, 2018), akan tetapi ini sangat jarang ditemui di laboratorium analisis karena membutuhkan instrumen khusus.

Dalam beberapa tahun terakhir, pengembangan sensor kimia sebagai alat pendeteksi analit asam askorbat dalam industri farmasi banyak dikembangkan para peneliti (Bi, Fernandes, Cardoso, & Freitas, 2016). Sensor kimia dirancang dengan mengimobilisasikan molekul pengenalan pada matriks pendukung. Molekul pengenalan ini yang akan berinteraksi dengan analit target yang sesuai (asam askorbat). Sensor kimia memiliki selektivitas yang baik (Hermanto et al., 2020), akan tetapi metode ini memiliki kelemahan yaitu pemakaiannya yang terbatas (efek *leaching* molekul pengenalan dari matriks pendukung) dan preparasi yang rumit. Secara umum, kelemahan yang ada pada beberapa metode analisis asam askorbat di atas adalah kemampuan memberikan data baik secara kualitatif maupun kuantitatif dengan tepat dan teliti. Hal ini dapat diatasi dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Kromatografi cair adalah metode yang berhasil untuk penentuan asam askorbat dengan selektivitas dan spesifisitas yang baik. KCKT dengan deteksi optik merupakan metode selektif dan sensitif untuk penilaian asam asborbat dalam bahan makanan dan cairan biologis menurut *AOAC Official Method 2012.22* (AOAC, 2012). Metode KCKT fase terbalik untuk penentuan kadar asam askorbat menawarkan keuntungan lain diantaranya kemudahan analisis, akurasi, spesivitas relatif, pengukuran yang cepat dan jumlah sampel yang kecil. Pada kajian ini, asam askorbat ditentukan menggunakan KCKT fase terbalik (Aulia, Sopyan & Muchtaridi, 2016). Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan metode titrimetri konvensional menggunakan *dichlorophenol indophenol* (DCPIP) sebagai indikator dalam penentuan titik akhir titrasinya. Penentuan kadar asam askorbat dilakukan pada sampel jus buah jeruk peras segar dengan kedua metode, yaitu metode KCKT fase terbalik dan metode titrimetri. Verifikasi sampel nyata yang akurat dapat digunakan sebagai patokan diet vitamin C yang dibutuhkan.

## METODE PENELITIAN

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan meliputi material standar asam askorbat dengan kemurnian 98,7% (Supelco), etanol p.a 99.5% (v/v) untuk kromatografi cair (LiChrosolv<sup>®</sup>), asam metafosfat p.a. 85% (Emsure<sup>®</sup>), asam asetat p.a, kalium fosfat monohidrat, 2,6-dikloroindophenol garam natrium dan natrium bikarbonat (Merck); air suling terdeionisasi (Brataco), dan penyaring 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatman). Sampel yang digunakan adalah jus buah jeruk peras segar.

Analisis kromatografi yang digunakan adalah KCKT produk dari Waters Breeze HPLC–USA (yang dilengkapi dengan berbagai piranti, yaitu *Waters Delta-600 pump*, *Waters 600-controller*, *Waters-2487 Dual l Absorbance Detector*). Kolom yang digunakan pada KCKT fas terbalik adalah merek SGE type 250CL4-ODS2-8/5  $\mu\text{m}$ , panjang 250 mm, diameter 4 mm dan *frit* 4/5  $\mu\text{m}$ . Sampel dianalisis dengan KCKT fase terbalik menggunakan metode standar internal dengan detector UV pada panjang gelombang maksimum 245 nm. Sebagai pembanding digunakan set alat volumetri/titrasi.

### Prosedur

#### *Preparasi bahan*

Larutan standar asam askorbat (hanya disiapkan pada saat digunakan) dibuat dengan memasukkan 50 mg asam askorbat ke labu ukur 50 mL dan encerkan larutan asam metafosfat-asam asetat, sehingga konsentrasinya kurang lebih 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan asam metafosfat-asam asetat tersebut dibuat dengan cara mencampurkan 100 mL air suling terdeionisasi (dd) dengan 20 mL asam asetat dalam gelas beaker 250 mL, kemudian tambahkan dan aduk hingga larut 7.5 g asam metafosfat dan encerkan campuran hingga 250 ml dengan air dd. Saring melalui saringan kertas bergalur ke dalam botol, tutup botol dengan stopper atau tutup dan simpan dalam lemari pendingin sampai digunakan.

Sebanyak 2.5 mL larutan standar diambil dan diencerkan dalam larutan asam metafosfat-asam asetat hingga 25 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan *intermediate* asam askorbat lebih kurang 100  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan *intermediate* asam askorbat ditambahkan larutan asam metafosfat-asam asetat untuk memperoleh larutan standar pengukuran kalibrasi dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50  $\mu\text{g/mL}$ . Saring dengan penyaring 0.45  $\mu\text{m}$  ke dalam botol vial KCKT dan simpan dalam lemari pendingin sampai digunakan.

Asam metafosfat-asam asetat merupakan pelarut yang bersifat asam, sehingga produk degradasi utama asam askorbat yaitu asam dehidro askorbat (bentuk asam askorbat yang mengalami oksidasi) dapat ditekan pembentukannya. Gugus hidroksi asam askorbat yang terletak pada posisi alfa dan beta terhadap atom C karbonil sangat mudah terionisasi pada pH yang semakin tinggi. Penggunaan air suling terdeionisasi (dd) pada pengenceran larutan asam metafosfat-asam asetat juga merupakan kontrol untuk membantu melindungi senyawa ini dari degradasi akibat adanya ion logam. Selain itu, penyimpanan larutan asam askorbat pada lemari pendingin (5 °C) dapat menjaga stabilitasnya.

#### *Prosedur Pengukuran*

Kondisikan KCKT fase terbalik sesuai kondisi umum antara lain fase gerak etanol dengan kecepatan alir 0.8 mL/min, waktu running 5 menit, volume injeksi 10  $\mu\text{L}$  dan detector UV. Untuk menentukan parameter operasi yang optimal untuk metode ini investigasi awal dilakukan, pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan dengan *scanning* pada panjang gelombang 200-400 nm. Larutan standar asam askorbat kemudian

disaring menggunakan penyaring *millipore* 0.45  $\mu\text{m}$  ke dalam vial KCKT dan diinjeksikan ke sistem KCKT. Analisis kuantitatif dalam penetapan kadar asam askorbat berdasarkan luas puncak/*area under curve* (AUC) dari larutan standar tersebut. Kurva kalibrasi merupakan grafik hubungan antara konsentrasi larutan standar versus AUC yang bersangkutan sehingga diperoleh persamaan regresi linear. Analisis kadar asam askorbat sampel dengan melarutkan 2 mL filtrat sampel dengan 20 mL etanol standar. Larutan sampel disaring menggunakan *millipore* 0.45  $\mu\text{m}$  ke dalam vial KCKT dan diinjeksikan ke sistem KCKT. Nilai AUC sampel digunakan untuk menentukan kadar asam askorbat dalam sampel berdasarkan kurva kalibrasi.

#### **Validasi Metode Analisis**

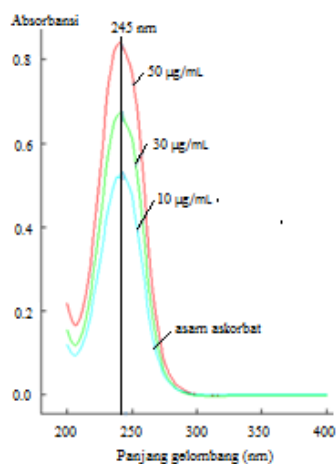
Penentuan kadar asam askorbat dilakukan pada sampel jus buah jeruk peras segar. Sampel dipreparasi sesuai dengan metode standar yang direkomendasikan oleh *AOAC official methods 967.21* (AOAC, 2006). Menghomogenkan sampel sampai merata dengan mengguncang untuk memastikan porsi uji yang seragam, dan saring melalui kapas penyerap atau saringan kertas bergalur.

Sampel jus buah jeruk peras segar disiapkan dengan menekan buah dan bubur buah dan lakukan penyaringan. Tambahkan alikuot dari jus yang diperoleh  $\geq 100$  mL dengan volume yang sama larutan asam metafosfat-asam asetat. Saring dengan penyaring 0.45  $\mu\text{m}$  ke dalam botol vial KCKT dan simpan dalam lemari pendingin sampai digunakan. Metode KCKT fase terbalik digunakan untuk estimasi kadar asam askorbat dalam sampel tersebut.

Metode titrimetri konvensional menggunakan dichlorophenol indophenol (DCPIP) sebagai indikator dalam penentuan titik akhir titrasinya, ini digunakan sebagai metode pembanding KCKT. Larutan pewarna indophenol dibuat dalam gelas beaker 150 mL dengan mencampurkan 50 mL air dd dan 42 mg natrium bikarbonat, kemudian ditambahkan dan aduk hingga larut 50 mg 2,6-dikloroindophenol garam natrium, setelah itu encerkan campuran hingga 200 mL dengan air dd. Saring melalui saringan kertas bergalur. Titik akhir titrasi ditentukan dengan adanya perubahan warna titrat dari merah mawar menjadi tidak berwarna. Kurva kalibrasi disiapkan untuk kedua metode, yaitu, metode KCKT fase terbalik dan metode titrimetri. Penentuan konsentrasi asam askorbat dalam sampel dilakukan dengan menggunakan metode adisi standar. Konsentrasi asam askorbat yang berbeda ditambahkan dalam sampel tersebut, kemudian metode KCKT fase terbalik divalidasi dengan metode standar titrimetri menurut *AOAC Official Method 967.21* (AOAC, 2006).

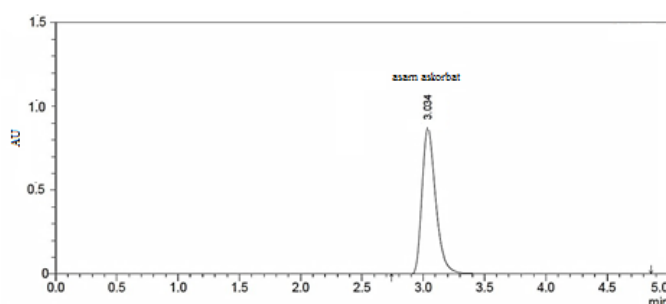
#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penetapan kadar asam askorbat dapat dilakukan melalui metode KCKT fase terbalik dengan detektor UV. Berdasarkan profil spectra serapan yang diperoleh menunjukkan panjang gelombang maksimum asam askorbat adalah 245 nm, seperti terlihat pada Gambar 1. Hasil menunjukkan kenaikan konsentrasi asam askorbat diikuti dengan semakin tinggi respon serapan yang terbentuk dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah tetap 245 nm. Panjang gelombang 245 nm digunakan untuk pengukuran dengan metode KCKT fase terbalik pada tahap selanjutnya.



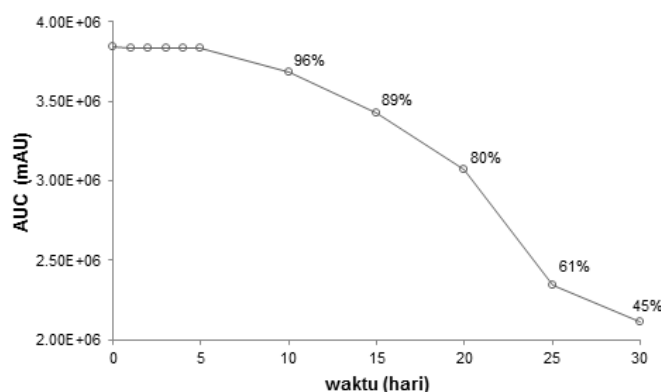
**Gambar 1.** Spektra serapan asam askorbat pada variasi konsentrasi 10, 30 dan 50 µg/mL

Parameter penting lain dalam analisis menggunakan metode KCKT fase terbalik adalah komponen fase gerak. Pada metode KCKT jenis ini, fase diam yang digunakan bersifat non-polar dan fase geraknya bersifat polar. Fase diam dalam kolom KCKT adalah oktadesil silika (ODS) yang merupakan hidrokarbon alkil bersifat non polar dengan kolom C-18 yang terikat pada basis silika. Sehingga fase gerak yang digunakan pada metode KCKT fase terbalik ini adalah pelarut polar, yaitu etanol 96%. Pemisahan terjadi pada kolom KCKT karena komponen sampel yang bersifat kurang polar akan melewati kolom kromatografi lebih lama dibandingkan komponen sampel yang bersifat lebih polar. Penelitian menunjukkan bahwa parameter kesesuaian sistem diperoleh dengan fase gerak yang mengandung etanol. Berdasarkan pada Gambar 2 fase gerak etanol 96% dapat mengelusi asam askorbat pada waktu retensi 3.034 menit.



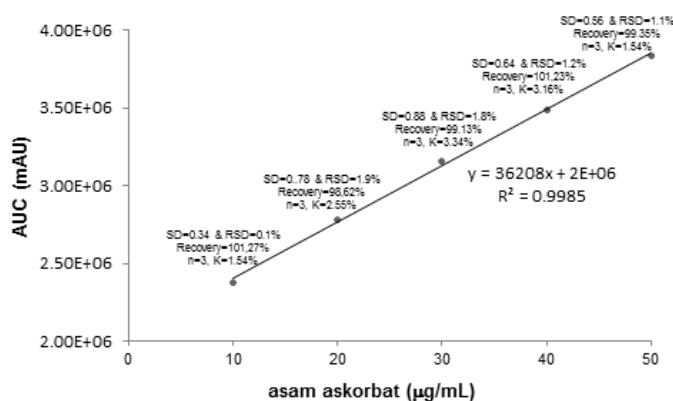
**Gambar 2.** Kromatogram larutan asam askorbat 100 µg/mL dalam pelarut asam metafosfat-asam asetat

Penggunaan asam metafosfat–asam asetat sebagai pelarut dengan pertimbangan stabilitas larutan asam askorbat dalam sistem KCKT digunakan. Asam askorbat merupakan zat yang mudah terdegradasi oleh enzim dan oksigen atmosfer yang dapat dipercepat oleh panas, cahaya, dan logam, sehingga penentuan stabilitas menjadi sangat penting. Stabilitas larutan asam askorbat dapat diamati pada Gambar 3. Larutan asam askorbat dalam pelarut asam metafosfat-asam asetat dengan penyimpanan pada suhu 5 °C digunakan sebagai larutan standar dalam penentuan kadar asam askorbat dengan metode KCKT fase terbalik ini.



**Gambar 3.** Stabilitas asam askorbat 50 µg/mL dalam pelarut asam metafosfat-asam asetat

Respon KCKT fase terbalik untuk pengukuran kadar asam askorbat telah diselidiki pada kondisi optimal. Kurva KCKT fase terbalik untuk pengukuran kadar asam askorbat menunjukkan perubahan nilai AUC karena konsentrasi asam askorbat. Karakteristik analitik digunakan untuk memvalidasi suatu metode analisis, hal ini dimungkinkan untuk meminimalisasi penyimpangan data analisis yang diperoleh dari keadaan sebenarnya. Validasi metode dilakukan bertujuan untuk memberikan hasil yang mendekati kebenaran. Karakteristik analisis dalam metode KCKT fase terbalik dalam menentukan kadar asam askorbat antara lain linieritas, batas deteksi, ketepatan dan ketelitian. Gambar 4 merupakan kurva kalibrasi KCKT fase terbalik untuk pengukuran kadar asam askorbat pada panjang gelombang absorbansi 245 nm.



**Gambar 4.** Kurva kalibrasi KCKT fase terbalik nilai AUC terhadap asam askorbat

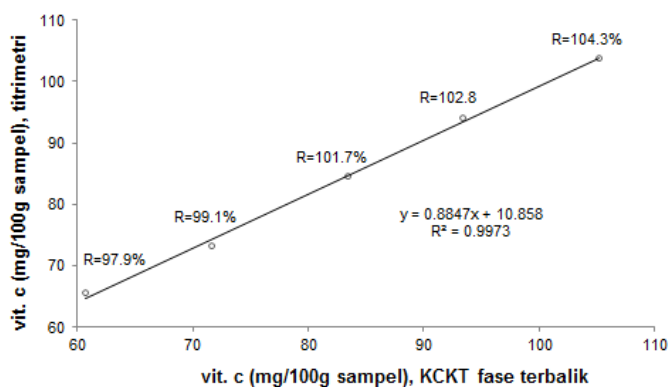
Nilai koefisien korelasi merupakan parameter linieritas dapat ditentukan melalui kurva kalibrasi. Gambar 4 menunjukkan daerah linier pada interval 10 hingga 50 µg/mL asam askorbat dalam pelarut asam metafosfat-asam asetat mengikuti persamaan garis  $y = 36208 [\text{asam askorbat}] + 2 \times 10^6$ . Berdasarkan kurva kalibrasi, nilai koefisien korelasi ( $r$ ) adalah 0.9991 atau  $r \approx 1$ , dengan demikian metode KCKT fase terbalik dalam menentukan kadar asam askorbat mempunyai linieritas tinggi. Pada kurva kalibrasi tersebut memiliki nilai  $r$  yang tidak berbeda secara signifikan dengan penelitian sebelumnya (Jubahar, Astuti & Suharti, 2015). Batas deteksi merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih memberikan respon signifikan (dapat dideteksi) dengan dibandingkan respon blanko. Perhitungan dari hasil penelitian menunjukkan nilai



batas deteksi senyawa standar asam askorbat adalah 0.5 µg/mL, artinya batas deteksi standar dibawah 0.5 µg/mL. Alat kromatografi cair dapat memberi respon pada konsentrasi yang sangat kecil yaitu 0.5 µg/mL, maka alat kromatografi cair mempunyai sensitivitas yang tinggi.

Validasi ketelitian dapat ditentukan dari simpangan baku dan koefisien variasinya. Standar deviasi relatif (RSD) menunjukkan suatu ketidakteelitian pengukuran. Pada Gambar 4 dapat diketahui kisaran RSD sebesar  $\leq 2\%$ , yang menunjukkan pengukuran dengan metode KCKT fase terbalik telah memberikan ketelitian dengan validitas tinggi. Ketepatan (K) dapat diungkapkan dengan kesalahan dimana nilai ketepatan tergantung pada besarnya penyimpangan data dari nilai rata-rata dengan nilai sebenarnya. Pada Gambar 4 juga dapat diketahui K sebesar  $\leq 5\%$ , hal ini berarti metode KCKT fase terbalik mempunyai validitas yang tinggi. Validasi parameter akurasi yang lain adalah *recovery*, dimana derajat persetujuan antara nilai yang terukur dengan nilai sebenarnya. Pada Gambar 4 juga menunjukkan nilai *recovery* yaitu  $> 2\%$  (rentang 98 – 102%), hal ini berarti metode KCKT memiliki *recovery* yang baik. Dari nilai yang diperoleh pada beberapa parameter diatas menunjukkan bahwa metode KCKT fase terbalik ini mempunyai validitas yang tinggi untuk penentuan kadar vitamin C seperti yang ditunjukkan oleh peneliti sebelumnya (Dipahayu & Permatasari, 2019).

Kinerja metode KCKT fase terbalik untuk aplikasi praktis dalam analisis sampel jus buah jeruk peras segar ditunjukkan dengan melakukan penentuan kadar asam askorbat dalam sampel. Kandungan asam askorbat dari sampel tersebut diukur dan hasil yang diringkas diberikan pada Gambar 5. Akurasi metode KCKT digunakan untuk menilai perbandingan dan memvalidasi metode yang biasa digunakan pada laboratorium dalam memantau kadar asam askorbatnya. Pada laboratorium dalam menentukan kadar asam askorbat biasa digunakan metode titrimetri seperti yang direkomendasikan oleh AOAC *Official Method 967.21* (AOAC, 2006).



Gambar 5. Validasi metode antara HPLC fasa terbalik vs titrimetri untuk penentuan kadar asam askorbat

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa metode KCKT fase terbalik berkorelasi baik dengan metode standar titrimetri dalam penentuan kadar asam askorbat berdasarkan pada koefisien korelasi dan kemiringan yang diperoleh ( $R^2 = 0.9973$ ; kemiringan = 0.8847), seperti yang terlihat pada Gambar 5. Hasil penetapan kadar vitamin C dalam sampel buah jeruk peras segar menggunakan metode KCKT fase terbalik dan metode titrimetri yaitu  $52.9057 \pm 0.17$  dan  $54.2066 \pm 0.87$  mg dalam 100 g sampel. Selain itu, berdasarkan analisis statistik (uji-t), tidak ada perbedaan signifikan untuk kedua metode yang digunakan. Persentase yang baik dari *recovery* yang diperoleh yaitu dalam kisaran 97.9-104.3% diperoleh.

Menurut AKG, anak di atas satu tahun membutuhkan asupan vitamin C sebanyak 40 mg. Sedangkan remaja berusia di atas 12 tahun perlu memenuhi kebutuhan vitamin C paling tidak 65-90 mg per hari dan orang dewasa di atas 18 tahun kebutuhan vitamin C harian adalah 75-90 mg (BPOM, 2016). Dari hasil penelitian diketahui kadar vitamin C dalam sampel buah jeruk peras segar adalah  $52.9057 \pm 0.17$  mg dalam 100 g sampel, sehingga dapat digunakan sebagai patokan diet vitamin C.

## SIMPULAN

Metode KCKT dengan fasa terbalik telah digunakan untuk menentukan konsentrasi asam askorbat dalam sampel dengan menggunakan pelarut asam metafosfat-asam asetat. Validasi metode analisis menunjukkan bahwa metode KCKT fasa terbalik memiliki ketelitian yang baik dengan nilai  $RSD \leq 2\%$ , limit deteksi rendah yaitu  $0.5 \mu\text{g/mL}$ , validitas dan recovery yang tinggi dengan nilai  $K \leq 5\%$  dan *recovery* pada rentang 98–102%. Penentuan kadar asam askorbat pada sampel jus buah jeruk peras segar diperoleh  $52.9057 \pm 0.17$  dalam 100 g sampel dengan metode HPLC fasa terbalik dan  $54.2066 \pm 0.87$  mg dengan menggunakan metode titrasi sebagai metode pembandingan. Berdasarkan uji statistik diperoleh bahwa hasil pengukuran kedua metode tidak berbeda secara signifikan. Oleh karenanya metode KCKT fasa terbalik dapat digunakan sebagai metode penentuan asam askorbat pada analisis rutin vitamin C.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al Majidi, M. I. H., Y-AlQubury, H. 2016. Determination of Vitamin C (ascorbic acid) Contents in various fruit and vegetable by UV-spectrophotometry and titration methods. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9(4), 2972–2974.
- AOAC. 2006. *Ascorbic Acid in Vitamin Preparations and Juices 2,6-Dichloroindophenol Titrimetric Method*, 6-7.
- AOAC. 2012. *Vitamin C (ascorbic acid) in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula by UHPLC-UV*, 1–2.
- Asmara, A. P., Amungkasi, H. K. 2019. Kajian Kinetika Pengaruh Lama Penyimpanan terhadap Kadar Vitamin C pada Buah Apel Malang (*Malus Sylvestris*). *Al Kimia*, 7(1), 136–146.
- Aulia, S. S., Sopyan, I., Muchtaridi. 2016. Penetapan Kadar Simvastatin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT): Review. *Farmaka*, 14(4), 70–78.
- Bi, H., Fernandes, C. A., Cardoso, S., Freitas, P. 2016. Interference-Blind Microfluidic Sensor for Ascorbic Acid Determination by UV/Vis Spectroscopy. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 224, 668–675.
- BPOM. 2016. Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 9 Tahun 2016 Tentang Acuan Label Gizi, 1-8.
- Dinesh, B., Yadav, B., Reddy, R. D., Padma, A. S., Sukumaran, M. K. 2015. Determination of Ascorbic Acid Content in Some Indian Spices. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(8), 864–868.
- Dipahayu, D., Permatasari, S. N. 2019. Pengaruh Metode Penggerusan Tablet Vitamin C



- Terhadap Kadar Bahan Aktif. *Jurnal Kimia Riset*, 4(2), 94-99.
- Du, J., Cullen, J. J., Buettner, G. R. 2012. Biochimica et Biophysica Acta Ascorbic Acid : Chemistry, Biology and the Treatment of Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826(2), 443–457.
- Firdous, J., Naveed, M., Karpagam, T., Karthi, G. B., Subashini, S. R. 2011. A New Photometric Method of Vitamin C in Tomato. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 1(2), 66–74.
- Grosso, G., Bei, R., Mistretta, A., Marventano, S., Calabrese, G., Masuelli, L., Giganti, M. G., Modesti, A., Galvano, F., Gazzolo, D. 2013. Effects of Vitamin C on Health: A Review of Evidence. *Frontiers in Bioscience*, 18(3), 1017–1029.
- Guglu, K., Sozgen, K., Tutem, E., Ozyurek, M., Aspak, R. 2005. Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid using Copper(II)–Neocuproine Reagent in Beverages and Pharmaceuticals. *Talanta*, 65, 1226–1232.
- Hasanin, T. H. A., Fujiwara, T. 2018. Flow-Injection Chemiluminescence Method for Sensitive Determination of Ascorbic Acid in Fruit Juices and Pharmaceutical Samples Using a Luminol–Flow-Injection Chemiluminescence Method for Sensitive Determination of Ascorbic Acid in Fruit Juices and Phar. *Analytical Sciences*, 34, 777–782.
- Hermanto, D., Ismillayli, N., Honiar, R., Andayani, I. G. A. S., Mariana, B., Sanjaya, R. K. 2020. Transparent Membrane of Polyelectrolyte Complex Doped with 2,6-Dichlorophenol-Indophenol as an Optical Sensor for Colorimetric Measurements of Ascorbic Acid. *Orient. J. Chem.* 36(4), 680-686.
- Jubahar, J., Astuti, Y., Suharti, N. 2015. Penetapan Kadar Vitamin C dari Buah Cabe Rawit (*Capsicum Frutescens L.*) dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Jurnal Farmasi Higea*, 7(2), 208-217.
- Matsuoka, Y., Yamato, M., Yamada, K. 2016. Fluorescence Probe for the Convenient and Sensitive Detection of Ascorbic Acid. *Journal of Clinical and Biochemical Nutrition*, 58(1), 16–22.
- Sharaa, I. El, Mussa, S. Ben. 2019. Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) Contents in Vegetable Samples by UV-Spectrophotometry and Redox Titration Methods and Estimation the Effect of Time , Cooking and Frozen on Ascorbic Acid Contents. *International Journal of Progressive Sciences and Technologies*, 15(2), 281–293.
- Tu, Y. J., Njus, D., Schlegel, H. B. 2017. A theoretical Study of Ascorbic Acid Oxidation and  $\text{HOO}\cdot/\text{O}_2\cdot^-$  Radical Scavenging. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15, 4417–4431.
- Zuo, R., Zhou, S., Zuo, Y., Deng, Y. 2015. Determination of Creatinine, Uric and Ascorbic Acid in Bovine Milk and Orange Juice by Hydrophilic Interaction HPLC. *Food Chemistry*, 182, 242–25.