

## Pengembangan *Molecular Imprinted Polymer* untuk Pemisahan Vitamin C dalam Sediaan Multivitamin

### Development of *Molecular Imprinted Polymer* for Separation of Vitamin C in Multivitamins

Untung Gunawan\*, Eko Adi Prasetyanto, Shannen Ivanka Gunardi

Department of Pharmacy, School of Medicine and Health Sciences, Atma Jaya Catholic University of Indonesia  
email: untung.gunawan@atmajaya.ac.id

(tanggal diterima: 24-01-2021, tanggal disetujui: 03-03-2021)

#### INTISARI

Vitamin C memiliki gugus kromofor dan dapat dianalisis menggunakan spektrofotometri UV, namun apabila matriks yang akan dianalisis berupa multivitamin yang kompleks diperlukan metode pemisahan yang selektif untuk mengurangi interferensi dari matriks. Salah satu metode pemisahan yang selektif dalam pemisahan adalah *Molecular Imprinted Polymer* (MIP) yang belum banyak digunakan dalam sampel multivitamin. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh MIP yang selektif untuk pemisahan vitamin C dalam sediaan multivitamin.

Metode penelitian meliputi pengamatan interaksi vitamin C dengan monomer fungsional menggunakan spektrofotometri UV. MIP disintesis dengan menggunakan metode ruah selama 24 jam pada suhu 60°C. MIP dikarakterisasi menggunakan spektrofotometri inframerah dan *scanning electron microscopy*. Selektivitas MIP ditentukan dengan pengujian faktor *imprinting* dan perbandingan perolehan kembalinya terhadap metode ekstraksi cair-cair (ECC) dan SPE C<sub>18</sub> untuk pemisahan vitamin C dalam sampel multivitamin di pasaran menggunakan metode yang telah tervalidasi.

Pergeseran hipsokromik menunjukkan adanya interaksi antara vitamin C dengan monomer fungsional di mana ikatan hidrogen berperan dominan dalam sintesis MIP. Faktor *imprinting* yang lebih dari 1 dan nilai perolehan kembali yang mendekati 100% menunjukkan selektivitas MIP terhadap vitamin C. MIP-1 memiliki selektivitas paling tinggi dibandingkan dengan metode ECC dan SPE C<sub>18</sub> untuk pemisahan vitamin C dalam sampel multivitamin dengan persen perolehan kembali berturut-turut sebesar 98,17±2,31%, 69,42±3,01%, dan 93,26±4,24%. MIP-1 yang dihasilkan selektif untuk pemisahan vitamin C dalam sediaan multivitamin.

**Kata kunci :** Vitamin C; Multivitamin; Pemisahan; MIP

#### ABSTRACT

Vitamin C has a chromophore group that can be analyzed using UV-Vis spectrophotometry, however, if the complex matrix to be analyzed like multivitamins, a selective separation method is required to eliminate matrix interferences. One of the selective separation methods is *Molecular Imprinted Polymer* (MIP) which hasn't been widely used in multivitamin samples. The purpose of this study was to obtain selective MIP for the separation of vitamin C in multivitamins..

Research methods included interaction observation of vitamin C with functional monomers using UV spectrophotometry, MIP was synthesized using a bulk method for 24 hours at 60°C. MIP was characterized using spectrophotometry, infrared, and scanning electron microscopy MIP selectivity was determined by the determination of *imprinting* factor and its recovery with the liquid-liquid extraction method (LLE) and SPE C<sub>18</sub> for separation of vitamin C in multivitamin samples on the market using a validated method.



Hypsochromic shift showed interaction between vitamin C and functional monomers, which hydrogen bonds were taking role in MIP synthesis. Imprinting factor more than 1 and recovery value close to 100% indicated MIP selectivity to vitamin C. MIP-1 had the highest selectivity compared to the ECC and SPE C18 methods for separation of vitamin C in multivitamin samples with the recovery of  $98.17 \pm 2.31\%$ ,  $69.42 \pm 3.01\%$ , and  $93.26 \pm 4.24\%$  respectively. Synthesized MIP-1 was selective for the separation of vitamin C in multivitamins.

**Keyword:** Vitamin C; Multivitamins; Separation; MIP

## 1. PENDAHULUAN

Penggunaan multivitamin secara rutin pada masyarakat di seluruh dunia meningkat secara signifikan setiap tahunnya, kebanyakan masyarakat menggunakan multivitamin secara rutin untuk pengobatan atau pencegahan penyakit kronis [1]. Terjadi peningkatan penggunaan multivitamin di tengah masa pandemi COVID-19 karena kemampuannya untuk menjaga sistem imun tubuh. Multivitamin memiliki efek imunomodulator yang memiliki peran penting dalam pencegahan dan terapi pendukung COVID-19 [2], [3]. Sebagian besar vitamin tidak dapat disintesis dalam tubuh sehingga diperlukan asupan dari luar. Vitamin dapat diklasifikasikan berdasarkan kelarutannya sebagai vitamin larut air (C dan B) dan vitamin larut lemak (A, D, E, dan K) [4].

Salah satu komponen yang sering digunakan dalam sediaan multivitamin adalah vitamin C. Vitamin C berfungsi membantu sintesis dan metabolisme tirosin, asam folat dan triptofan, hidroksilasi glisin, prolin, lisin karnitin dan katekolamin. Kekurangan vitamin C sering dikaitkan dengan penyakit anemia, infeksi, gusi berdarah, skorbut, penyembuhan luka yang buruk, perdarahan kapiler, degenerasi otot, plak aterosklerotik, dan gangguan sistem saraf [5], [6]. Vitamin C dapat digunakan sebagai terapi pendukung dalam penanganan COVID-19 karena kemampuannya sebagai antioksidan, antiinflamasi, antitrombotik dan imunodulator. Beberapa penelitian mengindikasikan penggunaan vitamin C untuk pencegahan, memperpendek waktu infeksi, dan mengurangi komplikasi penyakit tanpa adanya efek samping yang dihasilkan [7], [8], [9], [10].

Berbagai metode analisis sudah banyak dikembangkan untuk analisis vitamin C dalam berbagai matriks, dimana metode yang umum digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) [11], [12], [13], [14], [15]. Sediaan multivitamin yang beredar di pasaran biasanya mengandung vitamin larut air, vitamin larut lemak, dan mineral lainnya. Vitamin dengan mineral tablet (VMT) yang lengkap mengandung 5 vitamin larut dalam minyak, 9 vitamin yang larut dalam air dan 17 elemen mineral dan merupakan salah satu sediaan farmasi yang banyak digunakan untuk suplemen vitamin dan mineral, penentuan vitamin yang larut dalam air (termasuk vitamin C) dalam VMT sulit karena ketidakstabilan sampel, polaritas yang tinggi, serta kompleksitas matriks [16].

Berdasarkan struktur kimianya, vitamin C memiliki gugus kromofor sehingga dapat dianalisis menggunakan spektrofotometri UV, namun apabila matriks yang akan dianalisis bersifat kompleks seperti multivitamin diperlukan metode pemisahan yang selektif sebagai faktor kunci dalam analisisnya [17], oleh



karena itu perlu dilakukan pengembangan metode untuk meningkatkan selektivitas pemisahan serta mereduksi waktu preparasi dan analisis sampel. Berbagai metode pemisahan untuk vitamin C dalam berbagai matriks sudah dikembangkan seperti ekstraksi cair-cair, ekstraksi fasa padat (SPE), dan *ultrasound-assisted extraction* [18], [19], [20], [21], [22]. Salah satu metode pemisahan yang banyak dikembangkan saat ini adalah *Molecular Imprinted Polymer* (MIP) karena metode ini bersifat selektif. Penelitian MIP yang ada belum diaplikasikan sebagai metode pemisahan untuk menggantikan metode lain seperti ekstraksi cair-cair maupun *Solid Phase Extraction* (SPE) untuk pemisahan vitamin C dalam sampel multivitamin [23], [24], [25], [26]. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh MIP yang selektif untuk pemisahan vitamin C dalam sediaan multivitamin.

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1. ALAT DAN BAHAN

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan digital Metler Toledo DRAGON 204<sup>®</sup>, hotplate stirrer IKA C-MAG HS 7<sup>®</sup>, mikropipet, Spektrofotometer ultraviolet (UV) UV Shimadzu UV-1800<sup>®</sup>, spektrofotometer inframerah (IR) Shimadzu IRTracer-100<sup>®</sup>, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Shimadzu Prominence<sup>®</sup> detektor Photo Diode Array (PDA), *Scanning Electron Microscope* (SEM)-EDX Zeiss EVO MA15<sup>®</sup>, *coating* sampel Quorum Q150T ES<sup>®</sup> dan alat gelas lainnya.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu, vitamin C (Sigma Aldrich), akrilamida (Sigma Aldrich), 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA, Sigma Aldrich), etilenglikoldimetakrilat (EGDMA, Sigma Aldrich), azobisisobutironitril (AIBN, Sigma Aldrich), asetonitril (Merck), metanol (Merck), kloroform (Merck), cartridge SPE kosong, cartridge SPE C<sub>18</sub> (Waters), sampel multivitamin.

### 2.2. CARA KERJA

#### **Sintesis *Molecular Imprinted Polymer* (MIP)**

Sintesis MIP diawali dengan mengamati interaksi antara molekul cetakan (vitamin C) dan monomer fungsional yaitu akrilamida dan HEMA, interaksi yang diamati berupa pembentukan ikatan hidrogen menggunakan spektrofotometer UV Shimadzu UV-1800<sup>®</sup>. Dilakukan penentuan konstanta asosiasinya (K<sub>a</sub>) untuk masing-masing monomer. Sintesis MIP dilakukan dengan metode ruah, molekul cetakan, monomer fungsional, pengikat silang, dan inisiator dilarutkan dalam pelarut porogen dalam satu wadah, digunakan EGDMA sebagai pengikat silang, AIBN sebagai inisiator reaksi, dan pelarut porogen berupa metanol. Vitamin C dilarutkan, kemudian ditambahkan monomer fungsional ke dalam vial dan disonikasi. Pengikat silang dan inisiator ditambahkan ke dalam vial, disonikasi, dan dialiri gas nitrogen, vial ditutup rapat, dimasukkan dalam oven 24 jam pada suhu 60°C. *Non Imprinted Polymer* (NIP) yaitu MIP yang dibuat tanpa menggunakan molekul cetakan juga dibuat dengan komposisi dan kondisi reaksi yang sama dengan MIP sebagai pembanding.



### **Karakterisasi MIP**

MIP dan NIP hasil sintesis dikarakterisasi menggunakan spektrofotometri IR Shimadzu IRTracer-100®, dan SEM-EDX Zeiss EVO MA15®. Pelepasan molekul cetakan MIP dioptimasi menggunakan sokhlet, refluks, dan sonikasi. Pengamatan pelepasan molekul cetakan dilakukan secara spektrofotometri inframerah. MIP diuji kemampuan pengikatan ulangnya dengan menginkubasikan MIP dengan larutan vitamin C kemudian diamati perbandingan antara kadar vitamin C awal dan yang sudah berinteraksi dengan MIP. Kapasitas adsorpsi dilakukan dengan membandingkan kemampuan MIP dan NIP dalam mengikat vitamin C, larutan vitamin C dengan dimasukkan ke dalam 3 vial, 1 vial berisi 10 mg MIP, 1 vial berisi 10 mg NIP, dan 1 vial tanpa isi (blanko), vial diinkubasi selama 24 jam untuk mengamati terjadinya interaksi antara vitamin C dengan MIP dan NIP, setelah 24 jam dilakukan analisis kadar vitamin C pada ketiga vial tersebut dan dilakukan penentuan kapasitas adsorpsi.

### **Pembuatan Molecular Imprinted Polymer Solid Phase Extraction (MISPE)**

MIP yang telah dikarakterisasi dikemas dalam kemasan seperti *Solid Phase Extraction* (SPE) untuk mempermudah penggunaan dalam pemisahan. 100 mg MIP dimasukkan ke dalam *cartridge* SPE kosong volume 2 mL kemudian ditutup dengan *frit* yang akan disebut sebagai MISPE. NIP diperlakukan sama dengan MIP sebagai pembanding yang akan disebut sebagai *Non-Imprinted Solid Phase Extraction* (NISPE).

### **Validasi Metode Analisis**

Validasi metode analisis vitamin C dilakukan menggunakan spektrofotometri UV dimana parameter yang diuji adalah linearitas, batas deteksi, batas kuantisasi, akurasi, dan presisi. Linearitas ditentukan dengan cara membuat kurva antara konsentrasi dengan respon Parameter linearitas kurva adalah koefisien korelasi ( $r$ ) dan koefisien variansi regresi ( $V_{x0}$ ). Batas deteksi dan batas kuantisasi dihitung dari perbandingan *signal to noise* dengan metode Miller dan Miller [27]. Akurasi diperoleh dengan cara menghitung rata-rata persen perolehan kembali analit yang ditambahkan. Parameter presisi diperoleh dari pengamatan koefisien variansi.

### **Pengaplikasian MIP**

Sebelum diaplikasikan untuk pemisahan vitamin C pada sampel multivitamin, dilakukan optimasi eluen untuk pemisahan menggunakan berbagai pelarut organik untuk memperoleh perolehan kembali tertinggi dari vitamin C. Selektivitas pemisahan diamati dengan menggunakan sampel multivitamin yang mengandung vitamin C yang beredar di pasaran. Pengujian selektivitas dilakukan dengan membandingkan antara MIP yang telah dibuat dengan dengan metode ekstraksi cair-cair (ECC) dan SPE C<sub>18</sub> untuk pemisahan vitamin C dalam sampel multivitamin.



### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Sintesis MIP

Sintesis MIP diawali dengan mengamati interaksi antara molekul cetakan (vitamin C) dengan monomer fungsional (akrilamida dan HEMA) dengan menggunakan titrasi UV, 0,0001 mol vitamin C ditambahkan larutan akrilamida dan HEMA masing-masing dengan perbandingan mol vitamin C : monomer (1:1 sampai 1:10) kemudian diukur panjang gelombang maksimum dan absorbansinya. Kemudian dilakukan penentuan konstanta asosiasi dengan menggunakan rumus:

$$\Delta\lambda = 1 + \frac{K[M]}{1+K[M]} - \Delta\lambda_{max} \dots\dots\dots \text{persamaan 1}$$

- $\Delta\lambda$  = selisih panjang gelombang
- K = konstanta asosiasi
- [M] = konsentrasi monomer
- $\Delta\lambda_{max}$  = selisih panjang gelombang maksimum

**Tabel 1. Titrasi UV vitamin C-akrilamida dan vitamin C-HEMA**

Vit C : akrilamida (mol:mol)	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Vit C : HEMA (mol:mol)	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
1:0	247,0	0,534	1:0	247,0	0,534
1:1	246,5	0,492	1:1	245,5	0,482
1:2	246,0	0,469	1:2	245,0	0,451
1:3	245,5	0,446	1:3	244,0	0,419
1:4	244,0	0,423	1:4	243,0	0,384
1:5	244,0	0,401	1:5	243,0	0,355
1:6	244,0	0,382	1:6	243,0	0,327
1:7	244,0	0,359	1:7	243,0	0,301
1:8	245,0	0,344	1:8	243,0	0,286
1:9	244,0	0,321	1:9	243,0	0,256
1:10	244,0	0,307	1:10	245,0	0,249

Dari hasil titrasi UV pada tabel 1 terjadi interaksi antara vitamin C dengan akrilamida dan HEMA. Ketika mulai ditambahkan monomer fungsional terjadi pergeseran hipsokromik yang menunjukkan bahwa ada interaksi dimana terjadi penurunan panjang gelombang seiring dengan peningkatan konsentrasi monomer yang ditambahkan sehingga dapat disimpulkan akrilamida dan HEMA merupakan monomer yang dapat digunakan dalam pembuatan sintesis MIP [28]. Dari tabel 1 diketahui perbandingan konsentrasi optimum untuk vitamin C berikatan dengan akrilamida dan HEMA adalah 1:4 (mol:mol), dimana setelah 1:4 tidak terjadi pergeseran panjang gelombang maksimal lagi. Nilai konstanta asosiasi antara vitamin C-akrilamida sebesar  $-2,3965 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  dan nilai konstanta asosiasi vitamin C-HEMA sebesar  $-2,1201 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

MIP disintesis menggunakan metode ruah, molekul cetakan, monomer fungsional, pengikat silang dan inisiator reaksi dimasukkan ke dalam satu wadah bersama pelarut porogen, kemudian diinkubasi pada temperatur 60°C untuk menginisiasi reaksi [29]. Optimasi sintesis dilakukan dengan mencari konsentrasi

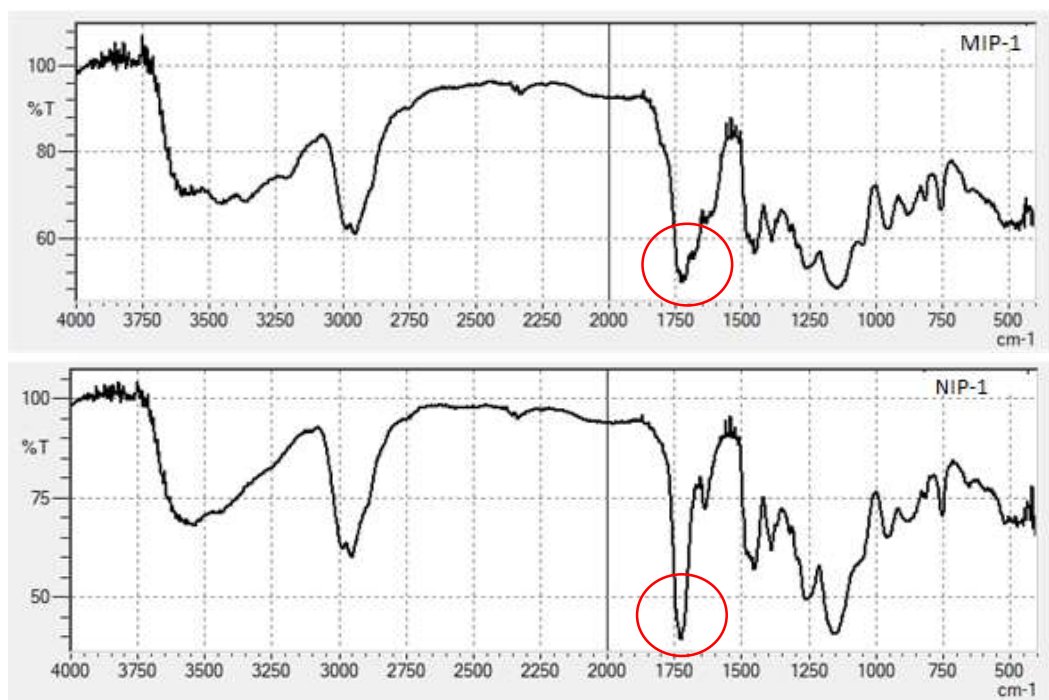


ideal perbandingan komponen MIP. MIP yang optimum diperoleh dengan perbandingan molekul cetakan: monomer fungsional: pengikat silang 1:4:20 (mol:mol:mol) dengan waktu sintesis selama 24 jam pada suhu 60°C. *Non-Imprinted Polymer* (NIP) yaitu MIP tanpa molekul cetakan disintesis dengan metode yang sama sebagai pembanding [30].

**Tabel 2. Sintesis MIP&NIP**

Kode polimer	Perbandingan mol molekul cetakan : monomer : pengikat silang
MIP-1	1:4:20 (monomer akrilamida)
NIP-1	0:4:20 (monomer akrilamida)
MIP-2	1:4:20 (monomer HEMA)
NIP-2	0:4:20 (monomer HEMA)

### Karakterisasi MIP

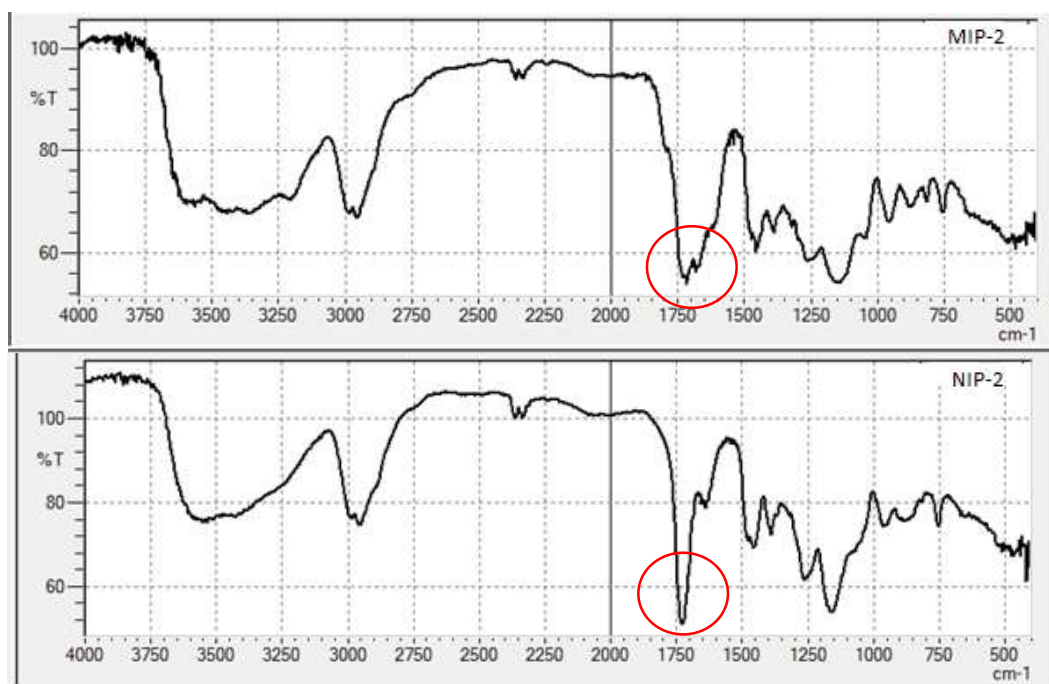


**Gambar 1. Spektrum Inframerah MIP-1 (atas) dan NIP-1 (bawah)**

MIP dan NIP dikarakterisasi menggunakan spektrofotometri IR dan SEM EDX untk mengamati dan membandingkan spektrum MIP dan NIP. Gambar 1 dan 2 menunjukkan perbedaan pada daerah ikatan gugus karbonil (1650–1800 cm<sup>-1</sup>), terbentuk interaksi berupa ikatan hidrogen pada dan MIP yang terbentuk antara gugus karbonil pada vitamin C dengan atom hidrogen pada monomer. Ikatan hidrogen membuat vitamin C terikat pada MIP yang ditunjukkan dengan penambahan puncak di daerah gugus karbonil pada spektrum [31]. Citra SEM pada gambar 3 dan 4 menunjukkan NIP memiliki bentuk yang lebih seragam

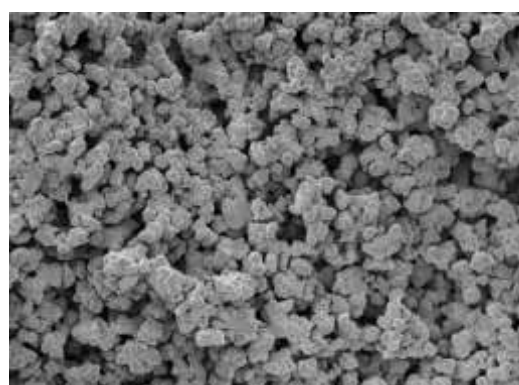
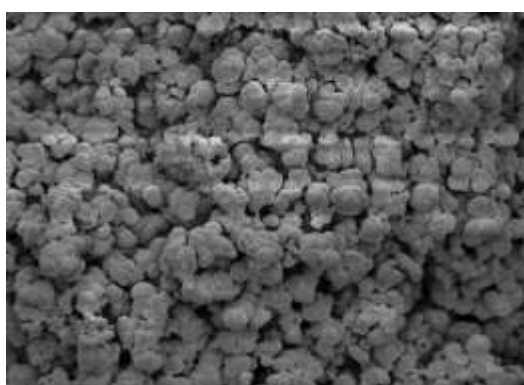
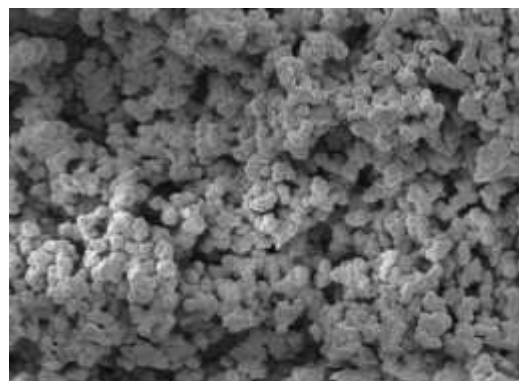
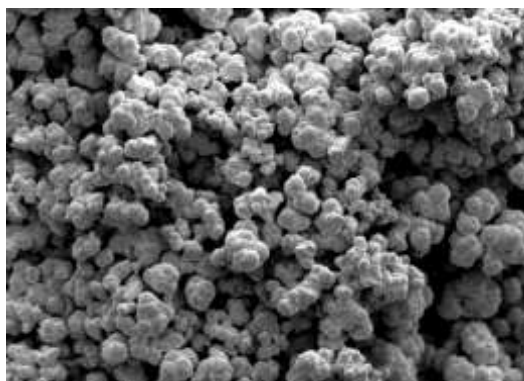
dibandingkan dengan MIP dan jumlah rongga yang lebih sedikit. Pada NIP ikatan yang terbentuk hanya dihasilkan dari monomer fungsional dan pengikat silang saja, tidak adanya ikatan yang terbentuk antara monomer fungsional dengan vitamin C. Pada MIP citra yang terbentuk lebih tidak seragam diakibatkan pembentukan ikatan antara vitamin C dengan monomer dan pengikat silang, rongga yang terbentuk juga memungkinkan sebagai ruang dalam pemisahan setelah dilakukan ekstraksi vitamin C sebagai molekul cetakan [32].

Pelepasan molekul cetakan pada MIP bertujuan pengenalan kembali dan memperoleh pori yang selektif terhadap vitamin C. Proses pelepasan molekul cetakan umumnya dilakukan menggunakan pelarut yang digunakan dalam sintesis atau pelarut yang dapat melarutkan molekul cetakan dengan mudah [33]. Optimasi ekstraksi dilakukan dengan soxhlet menggunakan metanol. Optimasi pelepasan molekul cetakan dilakukan menggunakan pelarut metanol:asam asetat dengan komposisi 99:1 (volume:volume), yang berfungsi untuk membantu pelepasan ikatan molekul cetakan dengan polimer.



Gambar 2. Spektrum Inframerah MIP-2 (atas) dan NIP-2 (bawah)

Kapasitas adsorpsi MIP dilakukan untuk mengamati kemampuannya dalam mengikat kembali vitamin C, kapasitas adsorpsi ditentukan dengan metode *batch* larutan vitamin C dimasukkan ke dalam 3 vial, vial pertama berisi 10 mg MIP, vial kedua berisi 10 mg NIP, dan vial ketiga tanpa isi (blanko), vial diinkubasi selama 24 jam, kemudian diamati penurunan respon hasil interaksi MIP, NIP, dan blanko [34]. Dari hasil penentuan kapasitas adsorpsi, MIP memiliki selektivitas lebih tinggi dalam mengikat vitamin C dibandingkan dengan NIP.



Gambar 3. Citra SEM MIP-1 (atas) dan NIP-1 (bawah)

Gambar 4. Citra SEM MIP-2 (atas) dan NIP-2 (bawah)

Tabel 3. Kapasitas adsorpsi MIP dan NIP

Kode polimer	% Pengikatan
NIP-1	32,81
NIP-2	28,79
MIP-1	64,35
MIP-2	58,71

### Pembuatan *Molecular Imprinted Polymer Solid Phase Extraction (MISPE)*

MISPE dibuat dengan memasukkan 100 mg MIP ke dalam *cartridge* SPE kosong volume 2 mL kemudian ditutup dengan *frit*. Pengujian MISPE diawali dengan melewati metanol pada MISPE untuk mengaktifkan gugus-gugus fungsional pada MISPE, kemudian larutan baku vitamin C sebanyak 0,5 mL dengan konsentrasi 1 µg/mL dilewatkan ke dalam MISPE dan dilakukan optimasi dengan berbagai eluen untuk memperoleh perolehan kembali vitamin C paling besar dari hasil pengujian [35]. Hasil optimasi eluen menunjukkan bahwa air:metanol (30:70) merupakan eluen yang memberikan perolehan kembali terbesar. Dari hasil pengujian juga dapat diamati faktor *imprinting* ( $\beta$ ) dengan mengamati perbandingan koefisien distribusi antara MIP dan NIP. Nilai  $\beta$  yang lebih besar dari 1 menunjukkan selektivitas MIP terhadap vitamin C, semakin besar nilai  $\beta$  maka semakin selektif MIP yang dihasilkan [36].



$$IF = \frac{K_D \text{ MISPE}}{K_D \text{ NISPE}} \dots\dots\dots \text{persamaan 2}$$

IF = faktor *Imprinting*  
 K<sub>D</sub> = Koefisien distribusi

**Tabel 4. Faktor *Imprinting* MIP-1 dan MIP-2**

Polimer	Koefisien Distribusi	Faktor <i>Imprinting</i> (β)
NIP-1	1,219	4,726
MIP-1	5,761	
NIP-2	1,162	2,404
MIP-2	2,793	

**Validasi Metode Analisis**

Validasi metode analisis dilakukan untuk menilai parameter tertentu berdasarkan pengujian laboratorium yang dibuktikan untuk memenuhi persyaratan dalam penggunaannya. Parameter yang divalidasi antara lain linearitas, batas deteksi, batas kuantisasi, akurasi, dan presisi. [37].

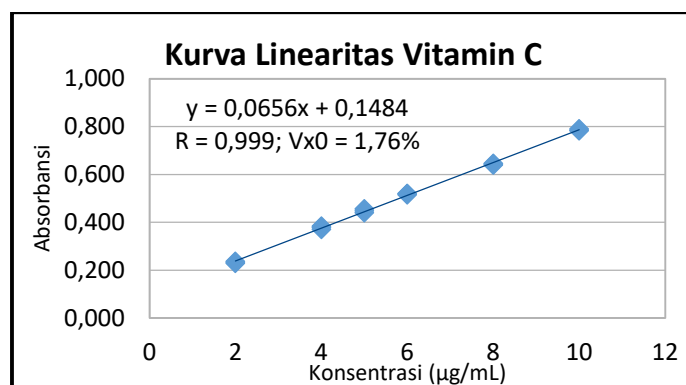
**Tabel 5. Pengujian stabilitas larutan vitamin C**

Menit	Absorbansi	Menit	Absorbansi
0	0,5380	16	0,5358
1	0,5384	17	0,5355
2	0,5376	18	0,5358
3	0,5378	19	0,5357
4	0,5379	20	0,5352
5	0,5373	21	0,5352
6	0,5377	22	0,5357
7	0,5372	23	0,5348
8	0,5378	24	0,5349
9	0,5370	25	0,5346
10	0,5364	26	0,5347
11	0,5365	27	0,5349
12	0,5364	28	0,5345
13	0,5359	29	0,5343
14	0,5361	30	0,5346
15	0,5361		
<b>Rerata</b>		0,5361	
<b>Standar deviasi</b>		0,0012	
<b>Koefisien variasi (%)</b>		0,23	

Sebelum validasi metode analisis, dilakukan pengujian kinetika untuk mengamati stabilitas larutan vitamin C setelah dipreparasi sampai dianalisis. Penelitian yang ada menunjukkan larutan vitamin C stabil pada rentang pH 1,0-8,4 sampai dengan 50 menit untuk analisis kuantitatif [38]. Pengujian stabilitas larutan dilakukan dengan mengamati absorbansi larutan vitamin C selama 30 menit dengan

selang pengambilan data setiap menitnya. Dari tabel 5 diamati larutan vitamin C stabil selama 30 menit dengan absorbansi yang relatif stabil dan nilai koefisien variasi (KV) sebesar 0,23%.

Parameter linearitas diuji menggunakan larutan vitamin C dengan konsentrasi 2, 4, 5, 6, 8, 10 µg/mL, dilakukan tiga kali replikasi, dari gambar 5 diperoleh rentang absorbansi antara 0,2 – 0,8 dengan koefisien variasi (r) sebesar 0,999, dan koefisien variasi fungsi regresi (Vx0) sebesar 1,76% yang menunjukkan bahwa metode memberikan hasil yang linear.



Gambar 5. Kurva lineritas vitamin C

Batas deteksi dan batas kuantisasi ditentukan untuk mengamati konsentrasi terkecil vitamin C yang dapat dianalisis, tabel 6 menunjukkan batas deteksi dan batas kuantiasi metode berturut-turut sebesar 0,34 µg/mL dan 1,02 µg/mL.

Tabel 6. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantisasi

Y	Y'	Kuadrat (Y-Y')	S (Y-Y')	Sy/x	(Sy/x)/b	LOD (ug/mL)	LOQ (ug/mL)
0,2330	0,2387	0,000032	0,0001	0,0057	0,1025	0,3382	1,0249
0,3780	0,3757	0,000005					
0,4490	0,4442	0,000023					
0,5183	0,5127	0,000032					
0,6437	0,6497	0,000036					
0,7867	0,7867	0,000000					

Parameter akurasi dan presisi diuji dengan metode standar adisi, dilakukan perbandingan antara vitamin C yang telah diketahui nilai benarnya sebagai standar dengan vitamin C yang ditambahkan ke dalam matriks tablet multivitamin. Pengujian menggunakan tiga level konsentrasi pada 4, 5, dan 6 µg/mL sebanyak tiga kali replikasi. Sampel multivitamin di pasaran mengandung vitamin C dengan konsentrasi 10-100%. Menurut guideline AOAC 2016, nilai perolehan kembali harus berada pada rentang 98-102% [39], tabel 7 menunjukkan nilai perolehan kembali sebesar 98,8 %; 101,3%, dan 100,8% untuk konsentrasi 4, 5, dan 6 µg/mL berturut-turut yang menunjukkan metode memberikan hasil yang akurat. Terdapat nilai perolehan kembali yang lebih dari 100% dikarenakan adanya ketidakpastian



analisis [40]. Parameter presisi diuji dengan menghitung nilai koefisien variasi yang diperoleh, untuk sampel dengan rentang konsentrasi 10-100% nilai koefisien variasi tidak boleh lebih besar dari 1,9%. Dari tabel 7 diperoleh metode yang presisi dengan nilai koefisien variasi sebesar 1,3%; 1,9%; dan 1,2% untuk konsentrasi 4, 5, dan 6 µg/mL berturut-turut.

**Tabel 7. Perhitungan akurasi dan presisi**

Konsentrasi Teroris (µg/mL)	Replikasi	Absorbansi	Konsentrasi terukur (µg/mL)	Perolehan kembali (%)	Rerata perolehan kembali (%)	Standar deviasi (s)	Koefisien variasi (%)
4	1	0,355	3,953	98,8	100,3	1,32	1,3
	2	0,364	4,053	101,3			
	3	0,362	4,031	100,8			
5	1	0,457	5,089	101,8	99,8	1,90	1,9
	2	0,447	4,978	99,6			
	3	0,440	4,900	98,0			
6	1	0,533	5,935	98,9	100,2	1,16	1,2
	2	0,542	6,036	100,6			
	3	0,545	6,069	101,2			

### Pengaplikasian MISPE

Pengujian selektivitas MIP-1 dan MIP-2 dilakukan dengan membandingkannya dengan ekstraksi cair-cair (ECC), dan SPE C<sub>18</sub> untuk pemisahan vitamin C dalam tablet multivitamin di pasaran. Pengujian dilakukan sebanyak tripplikasi, sampel vitamin C digerus hingga halus, ditambahkan metanol dan disonikasi, kemudian vitamin C dalam larutan dipisahkan menggunakan ECC, SPE C<sub>18</sub>, MIP-1, dan MIP-2. Larutan yang telah dipreparasi dianalisis dengan spektrofotometer UV menggunakan metode yang telah divalidasi dan dibandingkan dengan larutan vitamin C standar. Perolehan kembali dianalisis dengan membandingkan absorbansi sampel yang telah dipreparasi dengan MIP, ECC, dan SPE C<sub>18</sub> terhadap absorbansi larutan vitamin C standar.

Tabel 8 menunjukkan MIP-1 memiliki selektivitas paling tinggi dalam pemisahan dengan perolehan kembali yang lebih besar dibandingkan dengan metode ECC, SPE C<sub>18</sub>, dan MIP-2.

**Tabel 8. Perolehan kembali MIP dengan SPE C<sub>18</sub> dan ECC (n=3)**

Metode pemisahan	Perolehan kembali (%)
ECC	69,42 ± 3,01
SPE C <sub>18</sub>	93,26±4,24
MIP-1	98,17±2,31
MIP-2	87,54±3,69

### 4. KESIMPULAN

MIP-1 yang yang dihasilkan selektif terhadap vitamin C dan memiliki selektivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode ekstraksi cair-cair maupun SPE C<sub>18</sub> untuk pemisahan vitamin C dalam sampel multivitamin di pasaran



dengan persen perolehan kembali berturut-turut sebesar  $98,17 \pm 2,31\%$ ,  $69,42 \pm 3,01\%$ , dan  $93,26 \pm 4,24\%$ .

## 5. DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Hamishehkar H, Ranjdoost F, Asgharian P, Mahmoodpoor A, Sanaie S. Vitamins, are they safe? *Adv Pharm Bull.* 2016;6(4):467-77. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.061>
- [2]. Gombart AF, Pierre A, Maggini S. A review of micronutrients and the immune system—working in harmony to reduce the risk of infection. *Nutrients.* 2020;12(1). <https://doi.org/10.3390/nu12010236>
- [3]. Shakoor H, Feehan J, Al AS, Ali HI, Platat C, Cheikh L, et al. Immune-boosting role of vitamins D , C , E , zinc , selenium and omega-3 fatty acids : Could they help against COVID-19? *Maturitas.* 2021;143:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2020.08.003>
- [4]. Chambial S, Dwivedi S, Shukla KK, John PJ, Sharma P. Vitamin C in disease prevention and cure: An overview. *Indian J Clin Biochem.* 2013;28(4):314-28. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0375-3>
- [5]. Schlueter AK, Johnston CS. Vitamin C: Overview and update. *Complement Health Pract Rev.* 2011;16(1):49-57. <https://doi.org/10.1177/15332101110392951>
- [6]. Devaki SJ, Raveendran RL. Vitamin C: Sources, Functions, Sensing and Analysis. *Vitam C.* 2017;3-20. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70162>
- [7]. Abobaker A, Alzwi A, Alraied AHA. Overview of the possible role of vitamin C in management of COVID-19. *Pharmacol Reports.* 2020;72(6):1517-28. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00176-1>
- [8]. Carr AC, Rowe S. The emerging role of vitamin c in the prevention and treatment of covid-19. *Nutrients.* 2020;12(11):1-8. <https://doi.org/10.3390/nu12113286>
- [9]. Hoang BX, Shaw G, Fang W, Han B. Possible application of high-dose vitamin C in the prevention and therapy of coronavirus infection. *JGAR.* 2020;23:256-262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2020.09.025>
- [10]. Holford P, Carr AC, Jovic TH, Ali SR, Whitaker IS, Marik PE, et al. Vitamin C— An adjunctive therapy for respiratory infection, sepsis and COVID-19. *Nutrients.* 2020;12(12):1-17. <https://doi.org/10.3390/nu12123760>
- [11]. Arayne MS, Najma S, Zakia B. Rapid and specific spectrophotometric and RP-HPLC methods for the determination of ascorbic acid in fruits juices and in human plasma. Vol. 31, *Journal of the Chemical Society of Pakistan.* 2009. p. 402-7.
- [12]. Kumar KR, Praveen Kumar P, Mallikarjuna Rao N. Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of ascorbic acid in health drinks. *J Chem Pharm Res.* 2011;3(3):363-74.
- [13]. Rojeab Y, Hassoun M, Hazelet E, Myers D. HPLC Method Development and Validation for Simultaneous Quantification of Vitamins C and K 3 in Hard



- Gelatin Capsules for their Potential Benefit in Postoperative Total Joint Arthroplasty. *Ann Clin Res Trials*. 2017;1(2):1–7.
- [14]. Kachhawah SS, Biswal B, Jain A. Method development and validation for the simultaneous estimation of ascorbic acid and folic acid vitamins by reverse-phase high-performance liquid chromatography method in cyanobacterial metabolites and nutraceutical formulation. *Asian J Pharm Clin Res*. 2016;9(3):9–11.
- [15]. Mitić SS, Kostić DA, Nasković-Dokić DC, Mitic MN. Rapid and reliable HPLC method for the determination of vitamin C in pharmaceutical samples. *Trop J Pharm Res*. 2011;10(1):105–11. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i1.66549>
- [16]. Jin P, Xia L, Li Z, Che N, Zou D, Hu X. Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in Vitamins with Minerals Tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;70:151–7. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.06.020>
- [17]. Tankiewicz M, Fenik J, Biziuk M. Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. *Talanta*. 2011;86(1):8–22. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.056>
- [18]. Nells HJ, Merchle G, Lavens P, Sorgeloos P, De Leenheer AP. Solid-Phase Extraction of Ascorbic Acid 2-Sulfate from Cysts of the Brine Shrimp *Artemia franciscana*. *Anal Chem*. 1994;66(8):1330–3. <https://doi.org/10.1021/ac00080a019>
- [19]. Tumbas VT, Dilas SM, Čanadanović-Brunet JM, Četković GS, Savatović SM. Solid-phase extraction of antioxidant compounds from commercial cranberry extract and its antiradical activity. *Acta Period Technol*. 2007;38:157–64. <https://doi.org/10.2298/APT0738157T>
- [20]. Said KAM, Radzi Z, Yakub I, Amin MAM. Extraction and quantitative determination of ascorbic acid from banana peel *Musa Acuminata* “Kepok.” *IJUM Eng J*. 2016;17(1):103–14. <https://doi.org/10.31436/iiumej.v17i1.576>
- [21]. Stan M, Soran ML, Marutoiu C. Extraction and HPLC determination of the ascorbic acid content of three indigenous spice plants. *J Anal Chem*. 2014;69(10):998–1002. <https://doi.org/10.1134/S106193481410013X>
- [22]. Legnerová Z, Šatínský D, Solich P. Using on-line solid phase extraction for simultaneous determination of ascorbic acid and rutin trihydrate by sequential injection analysis. *Anal Chim Acta*. 2003;497(1–2):165–74. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.07.007>
- [23]. Prasad BB, Srivastava S, Tiwari K, Sharma PS. Ascorbic acid sensor based on molecularly imprinted polymer-modified hanging mercury drop electrode. *Mater Sci Eng C*. 2009;29(4):1082–7. DOI: 10.1016/j.msec.2008.09.025. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.09.025>
- [24]. Tiwari MP, Madhuri R, Kumar D, Jauhari D, Prasad BB. Double imprinting in a single molecularly imprinted polymer format for the determination of ascorbic



- acid and dopamine. *Adv Mater Lett.* 2011;2(4):276–80. <https://doi.org/10.5185/amlett.indias.202>
- [25]. Roy AK, Nisha VS, Dhand C, Malhotra BD. Molecularly imprinted polyaniline film for ascorbic acid detection. *J Mol Recognit.* 2011;24(4):700–6. <https://doi.org/10.1002/jmr.1104>
- [26]. Prasad BB, Tiwari K, Singh M, Sharma PS, Patel AK, Srivastava S. Molecularly imprinted polymer-based solid-phase microextraction fiber coupled with molecularly imprinted polymer-based sensor for ultratrace analysis of ascorbic acid. *J Chromatogr A.* 2008;1198–1199(1–2):59–66. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.059>
- [27]. Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5<sup>th</sup> ed. Edinburgh. Pearson Prentice Hall. 2005.
- [28]. Damayanti S, Gunawan U, Ibrahim S. Development of molecular imprinted polymer solid phase extraction for separation nitrofurantoin residue in chicken eggs. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017;10(6):108–11. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i6.17109>
- [29]. Yan H, Kyung HR. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *Int J Mol Sci.* 2006;7(5–6):155–78. <https://doi.org/10.3390/i7050155>
- [30]. Haupt K. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *Analyst.* 2001;126(6):747–56. <https://doi.org/10.1039/b102799a>
- [31]. Hasanah AN, Sari TN, Wijaya N, Kartasasmita RE, Ibrahim S. Study of the binding ability of molecular imprinted solid phase extraction for glibenclamide by optimizing template: Monomer: Crosslinker ratio. *Int J Chem Sci.* 2014;12(3):863–70.
- [32]. Lorenzo CA, Concheiro A. *Handbook of Molecularly Imprinted Polymer*. United Kingdom: Smithers Rapra; 2013
- [33]. Lorenzo RA, Carro AM, Lorenzo CA, Concheiro A. To remove or not to remove? The challenge of extracting the template to make the cavities available in molecularly imprinted polymers (MIPs). *Int J Mol Sci.* 2011;12(7):4327–47. <https://doi.org/10.3390/ijms12074327>
- [34]. Vasapollo G, Sole R Del, Mergola L, Lazzoi MR, Scardino A, Scorrano S, et al. Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective. *Int J Mol Sci.* 2011;12(9):5908–45. <https://doi.org/10.3390/ijms12095908>
- [35]. Simpson NJ. *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. California: Marcel Dekker; 2000. <https://doi.org/10.1201/9781420056242>
- [36]. Zhang W, She X, Wang L, Fan H, Zhou Q, Huang X, et al. Preparation, characterization and application of a molecularly imprinted polymer for selective recognition of sulphuric acid. *Materials (Basel).* 2017;10(5).
- [37]. Harmita. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan Cara Perhitungannya (Guideline and practical approach of analytical method validation). *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2004; 1(3): 117-135. <https://doi.org/10.7454/psr.v1i3.3375>



- [38]. Golubitskii GB, Budko E V., Basova EM, Kostarnoi A V., Ivanov VM. Stability of ascorbic acid in aqueous and aqueous-organic solutions for quantitative determination. *J Anal Chem.* 2007;62(8):742-7. <https://doi.org/10.1134/S1061934807080096>
- [39]. AOAC International. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *AOAC Off Methods Anal.* 2016;9.
- [40]. Gustavo González A, Ángeles Herrador M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2007;26(3):227-38. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>

