

**ANALISIS KUANTITATIF THIAMIN HIDROKLORIDA DAN RIBOFLAVIN  
DALAM SUSU KENTAL MANIS  
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**ISABELA SURYANTI**

**0305050353**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN FARMASI  
DEPOK  
2009**

**ANALISIS KUANTITATIF THIAMIN HIDROKLORIDA DAN RIBOFLAVIN  
DALAM SUSU KENTAL MANIS  
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

**Oleh:**

**ISABELA SURYANTI**

**0305050353**



**DEPOK**

**2009**

SKRIPSI : ANALISIS KUANTITATIF THIAMIN HIDROKLORIDA DAN  
RIBOFLAVIN DALAM SUSU KENTAL MANIS SECARA  
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

NAMA : ISABELA SURYANTI

NPM : 0305050353

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2009



Dr. Harmita, Apt  
PEMBIMBING I



Drs. Hayun, MSi  
PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana: 7 Juli 2009

Penguji I : Dra. Maryati Kurniadi, MSi

Penguji II : Dr. Yahdiana Harahap, MS

Penguji III: Dra. Rosmaladewi Aziz

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan rahmat-Nya yang berlimpah sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt, sebagai Ketua Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
2. Bapak Dr. Harmita, Apt dan Bapak Drs. Hayun, MSi, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Ibu Dra. Azizahwati, MS., selaku pembimbing akademik.
4. Seluruh staff pengajar Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
5. Seluruh karyawan Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
6. Ibu Anita Ekajanty dari PT. Kalbe Farma atas bahan baku penelitian yang diberikan.
7. Kedua orang tua penulis, Tjandra Legawa dan Erni Ramahwati Halim atas kasih sayang, semangat, dan dukungan yang diberikan.
8. Luci, Eci, Stephanie, dan Oliph atas semangat, bantuan, perhatian, dan masukan yang kalian berikan.

9. Frans Indrata atas semangat, dukungan, kesabaran, serta waktu dan tenaga untuk pencarian standar dan sampel.
10. Frater Khrisma atas doa, semangat, dan dukungan yang diberikan.
11. Teman-teman di farmasi yang telah berjuang bersama-sama dalam menyelesaikan penelitian ini.
12. Seluruh pihak yang telah banyak membantu baik moril maupun materil selama penulisan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu kritik dan saran yang membangun penulis harapkan untuk perbaikan di masa depan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan pada umumnya dan bidang farmasi pada khususnya.

Penulis

2009

## ABSTRAK

Vitamin merupakan substansi organik yang terdapat pada susu kental manis. Thiamin hidroklorida dan riboflavin dalam susu kental manis terdapat dalam jumlah kecil. Perlu dilakukan percobaan untuk menetapkan kadar kedua vitamin secara selektif dalam matriks susu kental manis. Metode analisis kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor fluoresensi telah dikembangkan untuk penetapan kadar thiamin hidroklorida yang dianalisis sebagai thiokrom dan riboflavin dalam susu kental manis. Kondisi optimum dengan kolom Kromasil® C18 menggunakan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v pada laju alir 1,0 mL/menit. Panjang gelombang eksitasi dan emisi thiokrom adalah 370 nm dan 435 nm, sedangkan riboflavin 445 nm dan 520 nm. Pada kondisi optimum, thiokrom memiliki waktu retensi 2,706 menit dan riboflavin 2,683 menit. Kurva kalibrasi thiokrom dengan rentang 0,05-0,3 ppm memiliki koefisien korelasi 0,9995 dan riboflavin dengan rentang 0,2-1 ppm memiliki koefisien korelasi 0,9994. Batas deteksi dan kuantitasi thiokrom adalah 0,0074 ppm dan 0,0248 ppm, sedangkan untuk riboflavin adalah 0,0258 ppm dan 0,0860 ppm. Hasil uji presisi thiokrom dan riboflavin memiliki koefisien variasi kurang dari 2%. Hasil perolehan kembali thiokrom dan riboflavin memberikan simpangan baku kurang dari 2%. Kadar thiamin hidroklorida dan riboflavin pada sampel 1 secara berturut-turut adalah  $4,67 \pm 0,91$  ppm ( $69,96 \pm 0,91\%$ ) dan  $3,00 \pm 0,27$

ppm ( $108,00 \pm 0,27\%$ ), sedangkan pada sampel 2 adalah  $0,62 \pm 0,81$  ppm ( $8,69 \pm 0,81\%$ ) dan  $3,76 \pm 0,89$  ppm ( $158,07 \pm 0,89\%$ ).

Kata Kunci: Fluoresensi, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Riboflavin, Susu Kental Manis, Thiamin Hidroklorida

xiii + 100 hlm.; gbr.; tab.; lamp.

Bibliografi: 24 (1963-2009)



## ABSTRACT

Vitamin is an organic substance that contained in sweetened condensed milk. Sweetened condensed milk contains thiamine hydrochloride and riboflavin in small amount. It is necessary to perform an experiment for determination of both vitamins in matrix sweetened condensed milk. A high performance liquid chromatographic method with fluorescence detector was developed for determination of thiamine hydrochloride which analyzed as thiochrome and riboflavin in sweetened condensed milk. Optimum condition was obtained with a C18 Kromasil® column use phosphate buffer pH 4-acetonitrile 40:60 v/v as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/minute. Excitation and emission wavelength for thiochrome are 370 nm and 435 nm, while riboflavin are 445 nm and 520 nm. In this optimum condition, thiochrome has retention time 2.706 minute and riboflavin 2.683 minute. Calibration curve of thiochrome with range of 0.05-0.3 ppm has coefficient of correlation 0.9995 and riboflavin with range of 0.2-1 ppm has coefficient of correlation 0.9994. Limit detection and quantitation of thiochrome are 0.0074 ppm and 0.0248 ppm, while riboflavin are 0.0258 ppm and 0.0860 ppm. Thiochrome and riboflavin have coefficient of variation was less than 2%. Recovery of thiochrome and riboflavin are giving standard deviation was less than 2%. Concentration of thiamine hydrochloride and riboflavin in sample 1 was  $4.67 \pm 0.91$  ppm ( $69.96 \pm 0.91\%$ ) and  $3.00 \pm 0.27$  ppm ( $108.00 \pm 0.27\%$ ),



while in sample 2 was  $0.62 \pm 0.81$  ppm ( $8.69 \pm 0.81\%$ ) and  $3.76 \pm 0.89$  ppm ( $158.07 \pm 0.89\%$ ).

Keywords: Fluorescence, High Performance Liquid Chromatographic,  
Riboflavin, Sweetened Condensed Milk, Thiamine Hydrochloride

xiii + 100 pages; figures; tables; appendixes

Bibliography: 24 (1963-2009)



## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	i
ABSTRAK .....	iii
ABSTRACT .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
A. Latar Belakang .....	1
B. Tujuan Penelitian .....	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
A. Susu .....	5
B. Thiamin Hidroklorida .....	10
C. Riboflavin .....	13
D. Metode-metode Ekstraksi Thiamin Hidroklorida dan Riboflavin dari Sampel Susu Kental Manis .....	15
E. Metode-metode Analisis Kuantitatif Thiamin Hidroklorida dan Riboflavin .....	17
F. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi .....	18
G. Validasi Metode Analisis .....	20

### BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA

A. Alat .....	25
B. Bahan .....	25
C. Cara Kerja .....	26

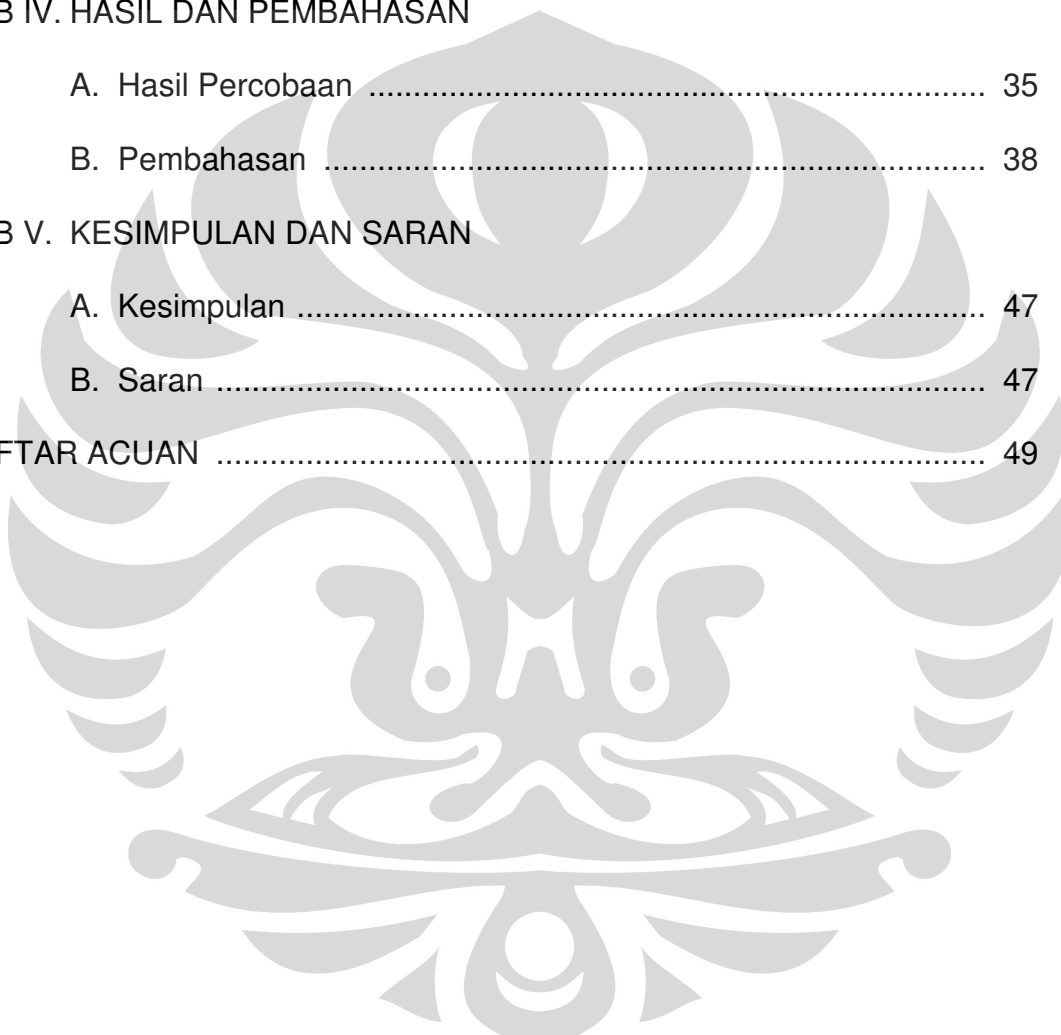
### BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Percobaan .....	35
B. Pembahasan .....	38

### BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan .....	47
B. Saran .....	47

DAFTAR ACUAN .....	49
--------------------	----



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Struktur kimia thiamin hidroklorida .....	10
2. Struktur kimia riboflavin .....	13
3. Reaksi oksidasi thiamin menjadi thiokrom .....	20
4. Alat kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu) terdiri dari pompa, injektor, kolom (Kromasil) C18 fase terbalik 5 $\mu$ m (25 x 0,46 cm), detektor fluoresensi, dan pengolah data (C-R4A) pada komputer .....	53
5. Alat spektrofotometer UV-Vis (Jasco V-530) .....	54
6. Spektrum serapan thiokrom 10,32 ppm dalam pelarut isobutanol .....	55
7. Spektrum serapan riboflavin 10,14 ppm dalam pelarut HCl 0,1N .....	56
8. Kromatogram thiokrom 0,1016 ppm dalam pelarut isobutanol dengan kondisi optimum thiokrom .....	57
9. Kromatogram baku pembanding riboflavin 0,596 ppm dalam pelarut isobutanol dengan kondisi optimum thiokrom .....	58
10. Kromatogram campuran thiokrom 0,1016 ppm dan riboflavin 0,516 ppm dalam pelarut isobutanol dengan kondisi optimum thiokrom .....	59
11. Kromatogram thiokrom 0,1016 ppm dalam pelarut isobutanol dengan kondisi optimum riboflavin .....	60
12. Kromatogram baku pembanding riboflavin 0,596 ppm dalam pelarut isobutanol dengan kondisi optimum riboflavin .....	61
13. Kromatogram baku pembanding riboflavin 0,596 ppm dalam pelarut HCl 0,1N dengan kondisi optimum riboflavin .....	62
14. Kromatogram campuran thiokrom 0,1016 ppm dan riboflavin 0,596 ppm dalam pelarut HCl 0,1N dengan kondisi optimum riboflavin .....	63
15. Kurva kalibrasi thiokrom .....	64

16. Kurva kalibrasi riboflavin .....	65
17. Kromatogram thiokrom pada sampel 1 dalam pelarut isobutanol .....	66
18. Kromatogram riboflavin pada sampel 1 dalam pelarut HCl 0,1N .....	67
19. Kromatogram thiokrom pada sampel 2 dalam pelarut isobutanol .....	68
20. Kromatogram riboflavin pada sampel 2 dalam pelarut HCl 0,1N .....	69



## DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Komposisi rata-rata beberapa produk susu .....	6
2. Kandungan berbagai vitamin pada susu .....	73
3. Komponen utama berbagai mineral pada susu .....	74
4. Asupan thiamin hidroklorida yang dianjurkan setiap hari .....	75
5. Asupan riboflavin yang dianjurkan setiap hari .....	76
6. Data waktu retensi, ukuran efisiensi kolom, jumlah pelat teoritis, faktor ikutan, dan luas segitiga thiokrom dan riboflavin pada berbagai kondisi berbeda .....	77
7. Data kurva kalibrasi dan linieritas thiokrom .....	78
8. Data kurva kalibrasi dan linieritas riboflavin .....	79
9. Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi thiokrom .....	80
10. Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi riboflavin .....	81
11. Hasil uji presisi thiokrom .....	82
12. Hasil uji presisi riboflavin .....	83
13. Hasil uji perolehan kembali thiamin hidroklorida yang dianalisis sebagai thiokrom .....	84
14. Hasil uji perolehan kembali riboflavin .....	85
15. Hasil penetapan kadar thiamin hidroklorida yang dianalisis sebagai thiokrom pada sampel 1 .....	86
16. Hasil penetapan kadar riboflavin pada sampel 1 .....	87
17. Hasil penetapan kadar thiamin hidroklorida yang dianalisis sebagai thiokrom pada sampel 2 .....	88

18. Hasil penetapan kadar riboflavin pada sampel 2 ..... 89



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Cara perhitungan linieritas .....	93
2. Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi .....	94
3. Cara perhitungan presisi .....	95
4. Cara perhitungan uji perolehan kembali .....	96
5. Cara perhitungan penetapan kadar .....	97
6. Sertifikat analisis thiamin hidroklorida .....	98
7. Sertifikat analisis riboflavin .....	99



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. LATAR BELAKANG**

Susu merupakan bahan pangan yang mempunyai nilai gizi tinggi karena mempunyai kandungan nutrisi yang lengkap seperti laktosa, lemak, protein, berbagai vitamin dan mineral. Susu dihasilkan selama periode laktasi baik oleh manusia maupun hewan menyusui seperti sapi, kambing, kerbau, dan hewan lainnya. Secara alami, tujuan diproduksinya susu adalah sebagai sumber nutrisi dan memberikan sistem kekebalan bagi anak yang baru dilahirkan (1).

Susu merupakan bagian yang tidak terpisahkan dari asupan makanan bergizi. Bayi di bawah umur 6 bulan wajib minum susu, hal tersebut disebabkan karena susu merupakan satu-satunya sumber makanan bagi bayi tersebut. Setelah bayi berusia 6 bulan, susu berfungsi sebagai pelengkap makanan. Di usia ini, bayi sudah sangat aktif dan mulai banyak membutuhkan zat gizi lain yang tidak terpenuhi hanya dengan susu (2).

Susu diperlukan sebagai makanan pelengkap karena kebutuhan gizi seperti mineral maupun vitamin tidak tercukupi dari makanan saja. Selain itu, kandungan gizi pada susu lebih mudah diserap dibandingkan makanan lain. Susu juga kaya akan kandungan triptofan yang bermanfaat mengistirahatkan sel-sel tubuh (2).

Susu yang beredar di pasaran ada beberapa jenis, diantaranya susu segar, susu sterilisasi atau susu UHT (*Ultra High Temperature*), susu pasteurisasi, susu kental manis, susu fermentasi, dan susu bubuk. Susu kental manis diperoleh dengan cara menghilangkan sebagian air melalui proses evaporasi (penguapan) sampai diperoleh kepekatan tertentu dan penambahan gula. Kandungan gizinya berbeda dari susu segar, bahkan kandungan vitaminnya lebih rendah dibandingkan susu segar (2).

Vitamin merupakan substansi organik yang terdapat dalam jumlah yang sedikit dalam susu tetapi merupakan komponen nutrisi yang sangat penting. Susu mengandung berbagai vitamin baik vitamin yang larut lemak seperti A, D, E, dan K serta vitamin yang larut air seperti B<sub>1</sub> (thiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin), B<sub>6</sub> (piridoksin), B<sub>12</sub> (sianokobalamin), niasin, dan asam pantotenat (3). Kadar thiamin hidroklorida dan riboflavin dapat ditentukan dengan spektrofotometri, fluorometri, KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) dengan detektor UV-Vis dan fluoresensi, serta KLT (Kromatografi Lapis Tipis) (4, 5, 6, 7).

Metode fluorometri thiokrom merupakan cara yang paling sering digunakan untuk vitamin B<sub>1</sub> karena sangat spesifik (8). Akan tetapi, kadar yang sangat kecil pada susu kental manis menimbulkan kesulitan untuk menentukan kadar thiamin hidroklorida dan riboflavin. Untuk menentukan kadar yang kecil tersebut digunakan KCKT dengan detektor fluoresensi karena sensitif atau peka dan dapat mendeteksi sampel dengan kadar yang sangat rendah, yaitu sampai dengan kadar ppt (*part per trillion*) (9).

Kondisi setiap laboratorium berbeda-beda dan terbatas peralatannya, oleh karena itu perlu dicari kondisi alternatif sesuai sarana dan prasarana yang ada di laboratorium sehingga terdapat beberapa pilihan untuk penetapan kadarnya sesuai kondisi laboratorium. Berdasarkan alasan di atas, untuk mendapatkan metode penetapan kadar alternatif yang peka dan selektif terhadap kadar kecil dari thiamin hidroklorida dan riboflavin dalam susu kental manis, maka perlu dilakukan penelitian.

## **B. TUJUAN PENELITIAN**

1. Memperoleh metode analisis kromatografi cair kinerja tinggi yang optimal dan tervalidasi untuk analisis kuantitatif thiamin hidroklorida dan riboflavin dalam susu kental manis.
2. Mengetahui kadar thiamin hidroklorida dan riboflavin dalam sampel susu kental manis.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. SUSU

Susu merupakan bahan pangan yang mempunyai nilai gizi tinggi karena mempunyai kandungan nutrisi yang lengkap seperti laktosa, lemak, protein, berbagai vitamin dan mineral. Susu dihasilkan selama periode laktasi baik oleh manusia maupun hewan menyusui seperti sapi, kambing, kerbau, dan hewan lainnya. Secara alami, tujuan diproduksinya susu adalah sebagai sumber nutrisi dan memberikan sistem kekebalan bagi anak yang baru dilahirkan. Susu sapi merupakan produk hewan menyusui yang paling banyak dikonsumsi masyarakat dunia dibandingkan susu dari hewan lain. Susu sapi biasanya diproduksi di kelenjar susu (*mammary gland*) dengan alveolus sebagai unit penghasil susu utama pada kelenjar tersebut (1).

Berdasarkan kandungan nutrisinya, susu didefinisikan sebagai larutan yang tersusun atas laktosa, protein terlarut, mineral, vitamin, enzim, zat asam dan berbagai komponen lain. Berdasarkan lemak yang dikandungnya, susu didefinisikan sebagai emulsi dari globula lemak yang mengandung lemak susu, vitamin larut lemak, dan membran dari globula. Dari sudut pandang protein kasein yang dikandungnya, susu didefinisikan sebagai suspensi koloid dari misel kasein (yang mengandung protein kasein, kalsium fosfat, sitrat, dan air), partikel lipoprotein dan protein globular (1).

Komposisi utama susu sering diartikan sebagai kandungan lemak, protein, laktosa (disakarida), abu, dan padatan total. Susu juga mengandung sejumlah kecil garam mineral, pigmen, enzim, dan vitamin. Plasma susu (*milk plasma*) adalah susu yang tidak mengandung globula lemak dengan komposisi yang hampir sama dengan susu skim dengan perbedaan susu skim masih sering mengandung lemak hasil proses pemisahan yang tidak sempurna. Serum susu (*milk serum*) adalah plasma susu tanpa mengandung misel kasein (*casein micelles*) dengan komposisi yang hampir sama dengan air dadih (*whey*) dengan perbedaan air dadih masih mengandung berbagai produk proteolitik dari enzim kimosin (1).

Tabel 1  
Komposisi rata-rata beberapa produk susu (10)

Kandungan utama	Susu Cair %	Susu Skim Cair %	Susu Evaporasi %	Susu Kental Manis %	Susu Bubuk %	Susu Skim Bubuk %	Mentega %
Air	87.0	90.5	73.7	27.0	3.5	3.5	90.5
Padatan total	13.0	9.5	26.3	73.0	96.5	96.5	9.5
Lemak	3.9	0.1	7.9	8.4	26.7	1.0	0.1
Padatan bukan lemak:	9.1	9.4	18.4	64.6	69.8	95.5	9.4
Laktosa	4.9	5.1	9.9	54.8 <sup>b</sup>	38.0	52.0	5.1
Protein	3.5	3.5	7.0	8.1	25.8	35.6	3.5
Abu	0.7	0.8	1.5	1.7	6.0	7.9	0.8

<sup>b</sup> Total gula (laktosa dan sukrosa)

Komposisi utama susu:

### 1. Lemak susu

Lemak dalam suspensi susu terdistribusi dalam bentuk emulsi yang terjadi karena lemak terdispersi dalam fase air (*oil in water emulsion*). Keberadaan lemak biasanya dalam bentuk globula lemak yang terlindungi oleh membran globula (*fat globule membrane*). Globula lemak merupakan partikel terbesar dalam susu dengan diameter berkisar antara 0,1–20  $\mu\text{m}$  dan rata-rata ukurannya sekitar 3–4  $\mu\text{m}$ . Sembilan puluh persen (90%) dari komponen lemak susu adalah asam-asam lemak yang terbagi atas asam lemak tidak jenuh (*unsaturated fatty acid*) dan asam lemak jenuh (*saturated fatty acid*) (3).

### 2. Protein susu

Protein susu adalah molekul yang tersusun atas unit-unit asam amino. Beberapa protein hanya mengandung 2 atau 3 asam amino, sedangkan protein lain tersusun atas ribuan asam amino. Protein susu diperkirakan mengandung sekitar 25 asam amino yang berbeda, beberapa diantaranya adalah asam amino esensial yang sangat penting bagi tubuh (3). Kasein, laktalbumin, dan laktoglobulin merupakan tiga protein yang penting dalam susu. Kasein merupakan protein terbanyak dalam susu, yaitu 2-3,5%, sedangkan laktalbumin 0,4-0,7 % dan laktoglobulin 0,2-0,3% (10).

### 3. Laktosa

Laktosa adalah komponen karbohidrat utama dalam susu yang merupakan disakarida yang terdiri dari glukosa dan galaktosa (10).

Komposisi laktosa dalam susu mencapai 4,8-5,2% dalam bentuk laktosa monohidrat. Disamping laktosa, susu sendiri mengandung berbagai komponen karbohidrat lain diantaranya adalah glukosa (1 mg/mL), galaktosa (1 mg/mL), dan oligosakarida (0,1 mg/mL) (3).

Komponen minoritas pada susu:

### 1. Vitamin

Vitamin merupakan substansi organik yang terdapat dalam jumlah yang sedikit dalam susu tetapi merupakan komponen nutrisi yang sangat penting. Susu mengandung berbagai vitamin baik vitamin yang larut lemak seperti A, D, E, dan K serta vitamin yang larut air seperti B<sub>1</sub> (thiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin), B<sub>6</sub> (piridoksin), B<sub>12</sub> (sianokobalamin), niasin, dan asam pantotenat (3). Kandungan vitamin pada susu dapat dilihat pada Tabel 2.

### 2. Mineral

Mineral susu merupakan sumber nutrisi yang penting bagi manusia. Hal ini disebabkan oleh keberadaan 21 jenis mineral pada susu yang merupakan mineral esensial bagi manusia. Konsentrasi mineral terbesar dalam susu adalah K dan Ca (3). Kandungan mineral pada susu dapat dilihat pada Tabel 3.

### 3. Enzim

Enzim dikenal sebagai biokatalisator suatu reaksi tetapi tidak ikut dalam reaksi itu sendiri. Beberapa enzim yang ada pada susu diantaranya

adalah lipase, fosfatase, amilase, laktase, galaktase, reduktase, peroksidase, dan katalase (10).

#### 4. Komponen lain dalam susu

Susu yang sehat mengandung leukosit dalam jumlah rendah. Kandungan ini akan meningkat jika terjadi infeksi pada ternak. Susu juga mengandung gas terlarut (5-9%), seperti karbondioksida, nitrogen, dan oksigen. Komponen lain yang sering terdapat dalam susu dalam jumlah yang sangat kecil adalah etanol, asam format, asam asetat, asam laktat, asam sitrat, ester fosfor, asam nukleat, dan berbagai nukleotida (3).

Beberapa jenis susu yang beredar di pasaran, antara lain:

##### 1. Susu segar

Susu segar adalah susu dari sapi, kerbau, kuda, kambing atau domba yang sehat dan tidak tercampur kolostrum. Susu segar memiliki citarasa paling baik dibanding susu cair yang telah diproses karena kandungan asam lemak susu (asam butirat) masih bagus (10).

##### 2. Susu sterilisasi atau susu UHT

Susu UHT adalah susu segar atau susu rekonstitusi atau susu rekombinasi yang disterilkan pada suhu tidak kurang dari 135°C selama 2 detik dan segera dikemas dalam kemasan steril (2).

##### 3. Susu pasteurisasi

Susu jenis ini diolah dengan pemanasan tidak kurang dari 143°F selama tidak kurang dari 30 menit atau pada suhu tidak kurang dari 160°F



selama tidak kurang dari 15 menit dan didinginkan pada suhu di bawah 50°F. Proses ini dapat membunuh bakteri patogen yang terdapat dalam susu sehingga susu dapat disimpan dengan waktu yang lebih lama (10).

#### 4. Susu kental manis

Susu kental manis dibuat dengan penguapan dan penambahan gula. Umumnya gula yang dipakai adalah sukrosa atau kombinasi sukrosa dengan dekstrosa. Penambahan gula dapat mencegah terjadinya kerusakan susu (10).

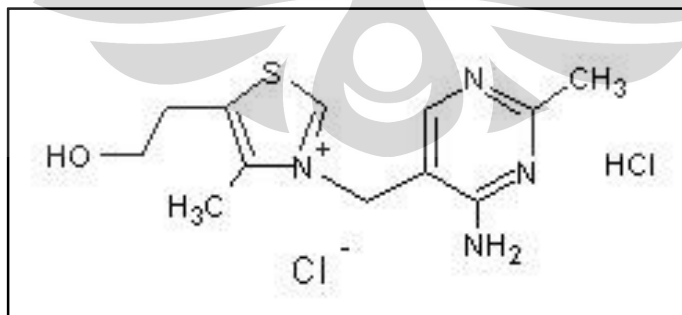
#### 5. Susu fermentasi

Susu fermentasi adalah susu yang mengalami fermentasi oleh mikroorganisme (10).

#### 6. Susu bubuk

Susu bubuk adalah susu segar yang mengalami proses penguapan, homogenisasi, dan pengeringan semprot (1).

### B. THIAMIN HIDROKLORIDA (11, 12, 13, 14, 15)



Gambar 1: Struktur kimia thiamin hidroklorida

Mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0%  $C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCl$  dihitung dari zat yang telah dikeringkan (11).

Berat Molekul : 337,27

Rumus Molekul :  $C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCl$

Sinonim : thiazolium,3-[(4-amino-2-metil-5-pirimidinil)metil]-5-(2-hidroksietil)-4-metil-, klorida, monohidroklorida.  
2-[3-[(4-amino-2-metil-pirimidin-5-il)metil]-4-metil-tiazol-5-il] etanol klorida.

Pemerian : hablur kecil atau serbuk hablur; putih; bau khas lemah mirip ragi; rasa pahit

Kelarutan : Mudah larut dalam air (1:1), sukar larut dalam etanol (95%) P, praktis tidak larut dalam aseton, alkohol terdehidrasi, eter P dan dalam benzen P, larut dalam gliserol P

Sumber : gandum, sayuran, buah-buahan, susu, kuning telur, daging, dan kacang-kacangan

Fungsi : ko-enzim dalam metabolisme karbohidrat

Asupan thiamin hidroklorida yang dianjurkan setiap hari dapat dilihat pada Tabel 4.

Metode uji thiamin hidroklorida yang dapat digunakan:

#### 1. Spektrofotometri (4)

$E_{1cm}^{1\%}$  dalam pelarut HCl 0,1N : 450 ( $\lambda_{maks}$  : 246 nm)

$E_{1cm}^{1\%}$  dalam pelarut NaOH 0,1N : 566 ( $\lambda_{maks}$  : 232 nm)

## 2. Fluorometri (5)

 $\lambda$  eksitasi = 365 nm $\lambda$  emisi = 435 nm

Ekstrak thiamin hidroklorida dioksidasi menjadi thiokrom terlebih dahulu dengan  $K_3Fe(CN)_6$  dalam NaOH.

Oksidasi thiamin hidroklorida menjadi thiokrom:

- a. Sebanyak 2 mL ekstrak ditambahkan 5 mL isobutanol dan dikocok dengan pengocok homogen selama 10 detik. Kemudian ditambahkan 5 mL  $K_3Fe(CN)_6$  0,04% dalam NaOH 15% dan dikocok dengan pengocok homogen selama 10 detik (17).
- b. Sebanyak 5 mL ekstrak ditambahkan 300  $\mu$ L  $K_3Fe(CN)_6$  1% dalam NaOH 15% dan dibiarkan bereaksi selama 10 menit dalam ruangan gelap. Kemudian dinetralkan dengan 200  $\mu$ L  $H_3PO_4$  dan saring dengan membran berpori berukuran 0,45  $\mu$ m (18).
- c. Sebanyak 3 mL reagen pengoksidasi ditambahkan kedalam larutan thiamin hidroklorida, lalu dikocok. Dalam waktu 30 detik, ditambahkan isobutanol dan dikocok selama 90 detik (14).

## 3. KCKT (6)

Kolom :  $\mu$ Bondapak C18

Fase gerak : metanol-natrium asetat (60:40 v/v)

Kecepatan aliran : 1,0 mL/menit

Detektor : Fluoresensi (  $\lambda_{ex}$  = 366 nm  $\lambda_{em}$  = 435 nm)

## 4. Kromatografi Lapis Tipis (7)

Plat : silika gel *Whatman* ( $R_f = 0,4$ )

silika gel *Merck* ( $R_f = 0,32$ )

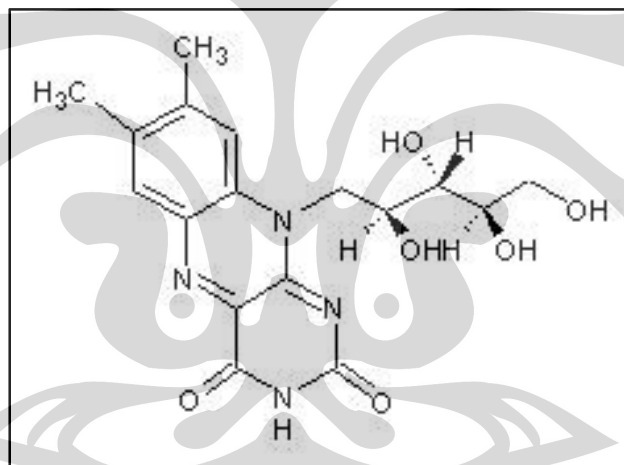
Fase gerak : 1-butanol-kloroform-asam asetat-amonia-air 7:4:5:1:1

Detektor : fluoresensi  $\lambda = 254$  nm (zona gelap)

fluoresensi  $E_x = 366$  nm (biru terang)

Reagen semprot : dragendorff

## C. RIBOFLAVIN (11, 12, 13, 14, 15)



Gambar 2: Struktur kimia riboflavin

Mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0%

$C_{17}H_{20}N_4O_6$  dihitung dari zat yang telah dikeringkan (11).

Berat Molekul : 376,37

Rumus Molekul :  $C_{17}H_{20}N_4O_6$

- Sinonim : 7,8-dimetil-10-(D-ribo-2,3,4,5-tetrahidroksipentil)benzo[g]pteridin-2,4(3H,10H)-dion
- Pemerian : serbuk hablur; kuning sampai kuning jingga; bau lemah; rasa agak pahit.
- Kelarutan : sangat sukar larut dalam air (1:3000 – 1:20000), etanol (95%) P dan dalam larutan natrium klorida isotonis, praktis tidak larut dalam alkohol, aseton, kloroform P dan dalam eter P, sangat mudah larut dalam larutan alkali encer.
- Sumber : daging, hati, ragi, susu, keju, telur, dan sayuran
- Fungsi : ko-enzim dari enzim pernapasan (flavoprotein)
- Asupan riboflavin yang dianjurkan setiap hari dapat dilihat pada Tabel 5.
- Metode uji riboflavin yang dapat digunakan:
1. Spektrofotometri (4)
 

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$  dalam pelarut HCl 0,1N : 820 ( $\lambda_{\text{maks}}$  : 267 nm)

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$  dalam pelarut NaOH 0,1N : 356 ( $\lambda_{\text{maks}}$  : 270 nm)
  2. Fluorometri (5)
 

$\lambda$  eksitasi = 440 nm       $\lambda$  emisi = 565 nm
  3. KCKT (6)
 

Kolom : Supelco LC-18

Fase gerak : asetonitril–buffer fosfat (pH 2,9) (14:86 v/v)

Kecepatan aliran : 1,0 mL/menit

Detektor : Floresensi ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 450 nm       $\lambda_{\text{em}}$  = 530 nm)

#### 4. Kromatografi Lapis Tipis (7)

Plat : silika gel *Whatman* ( $R_f = 0,71$ )

silika gel *Merck* ( $R_f = 0,51$ )

Fase gerak : 1-butanol-kloroform-asam asetat-amonia-air 7:4:5:1:1

Detektor : fluoresensi  $\lambda = 254$  nm (kuning)

fluoresensi Ex = 366 nm (kuning)

#### **D. METODE-METODE EKSTRAKSI THIAMIN HIDROKLORIDA DAN RIBOFLAVIN DARI SAMPEL SUSU KENTAL MANIS**

1. Sebanyak 50 mL HCl 0,1N ditambahkan pada 5 g sampel, dimasukkan ke dalam autoklaf suhu 121 °C selama 30 menit, dan didinginkan pada suhu ruang. pH diatur menjadi  $4,5 \pm 0,1$  dengan NaOH 1M. Sebanyak 5 mL enzim ditambahkan ke dalam ekstrak dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Setelah inkubasi, dipanaskan sampai 100°C selama 5 menit untuk mendeaktivasi enzim sebelum didinginkan pada suhu kamar. Ekstrak diencerkan menjadi 100 mL dan disaring dengan Whatman 42 (17).
2. Sebanyak 30 mL HCl 0,1N ditambahkan pada 2 g sampel. Larutan ini dipanaskan dengan penangas air pada suhu 95-100°C selama 30 menit. Ekstrak didinginkan dan pH diatur menjadi 4-4,5 dengan natrium asetat 5M. Sebanyak 500 mg enzim takadiastase ditambahkan pada ekstrak dan diinkubasi dengan penangas air pada suhu 45-50°C selama 5 jam. Kemudian ditambahkan 1 mL TCA 50% dan dipanaskan dengan

penangas air pada suhu 95-100°C. Setelah didinginkan, volume dicukupkan hingga 50 mL dengan HCl 0,1N dan disaring (18).

3. Sebanyak 50 mL HCl 0,1N ditambahkan pada sampel dan diletakkan dalam penangas air dengan suhu 100°C atau autoklaf 121°C selama 30 menit. Setelah didinginkan pada suhu kamar, pH diatur menjadi 4,0-4,5 dengan natrium asetat 2,5M. Kemudian ditambahkan enzim takadiastase, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam, diencerkan sampai 100 mL, dan disaring (19).
4. Sebanyak 50 mL HCl 0,1N ditambahkan pada sampel dan diletakkan dalam penangas air dengan suhu 100°C atau autoklaf 121°C selama 30 menit. Setelah didinginkan pada suhu kamar, pH diatur menjadi 4,0-4,5 dengan natrium asetat 2,5M, diencerkan sampai 100 mL, dan disaring (19).
5. Natrium asetat 0,05M (pH 4,5) dan 500 mg enzim takadiastase ditambahkan pada 50 mL sampel. Larutan tersebut diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C, diencerkan sampai 100 mL, dan disaring (19).
6. Natrium asetat 0,05M (pH 4,5) ditambahkan pada 50 mL sampel. Larutan tersebut diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C, diencerkan sampai 100 mL dan disaring (19).
7. Natrium asetat 0,05M (pH 4,5) dan campuran 100 mg papain, 500 µL glutation 1%, 20 mg asam fosfat, dan 10 mg α-amilase ditambahkan pada 50 mL sampel. Larutan tersebut diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C, diencerkan sampai 100 mL, dan disaring (19).

8. Natrium asetat 0,05M (pH 4,5) dan campuran 100 mg papain, 500  $\mu$ L glutation 1%, dan 10 mg  $\alpha$ -amilase ditambahkan pada 50 mL sampel. Larutan tersebut diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C, diencerkan sampai 100 mL, dan disaring (19).

#### **E. METODE-METODE ANALISIS KUANTITATIF THIAMIN HIDROKLORIDA DAN RIBOFLAVIN**

1. Analisis kuantitatif thiamin hidroklorida dan riboflavin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan fase gerak buffer fosfat pH 3-asetonitril (84:16 v/v), dan detektor fluoresensi (20).
2. Analisis kuantitatif thiamin hidroklorida dan riboflavin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan kolom C18 fase terbalik, fase gerak kalium dihidrogen fosfat-asetonitril-metanol (60:10:30 v/v/v), kecepatan alir 0,7 mL/menit, volume injeksi 50  $\mu$ L, suhu 25°C, dan detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 365 nm untuk thiamin hidroklorida dan 440 nm untuk riboflavin, serta panjang gelombang emisi 435 nm untuk thiamin hidroklorida dan 565 nm untuk riboflavin (17).
3. Analisis kuantitatif thiamin hidroklorida dan riboflavin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan kolom C18 fase terbalik, fase gerak 0,3% trietilamin (TEA) pH7,4-metanol (80:20 v/v), kecepatan alir 1,0 mL/menit, volume injeksi 100  $\mu$ L, suhu 25°C, dan detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 365 nm untuk thiamin hidroklorida



dan 422 nm untuk riboflavin, serta panjang gelombang emisi 436 nm untuk thiamin hidroklorida dan 515 nm untuk riboflavin (18).

4. Analisis kuantitatif thiamin hidroklorida dan riboflavin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan kolom C18 fase terbalik, fase gerak asetonitril-metanol, dan detektor fluoresensi (19).

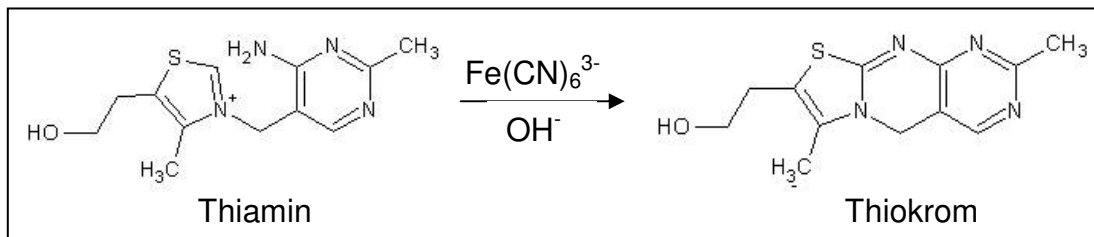
## **F. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

Kromatografi cair kinerja tinggi adalah teknik pemisahan zat berdasarkan fase diam yang berupa zat padat dan fase gerak yang berupa cairan. Pemisahan dicapai dengan partisi, adsorpsi, atau pertukaran ion bergantung pada fase diam yang digunakan. KCKT mempunyai kelebihan dibandingkan kromatografi gas untuk analisis senyawa organik. Senyawa yang dianalisis dilarutkan dalam pelarut yang sesuai dan hampir semua pemisahan dilakukan pada suhu kamar (14).

Umumnya analisis sediaan farmasi berdasarkan kromatografi partisi dan selesai dalam waktu 30 menit. Waktu elusi dari suatu senyawa dapat digambarkan dengan faktor kapasitas ( $k'$ ) yang tergantung pada senyawa kimia alami dari analit, komposisi dan laju alir fase gerak, serta komposisi dan luas permukaan fase diam. Panjang kolom merupakan faktor penting untuk menentukan resolusi. Hanya senyawa yang mempunyai faktor kapasitas berbeda yang dapat dipisahkan dengan KCKT (14).

Detektor KCKT ada bermacam-macam, diantaranya detektor serapan optik, detektor fluoresensi, detektor indeks bias, detektor *evaporative light scattering*, dan detektor elektrokimia. Detektor fluoresensi pada KCKT mempunyai desain yang sama dengan fluorometer dan spektrofluorometer. Pada umumnya, fluoresensi diamati dengan detektor fotoelektrik yang berlokasi pada  $90^\circ$  dari sinar eksitasi. Detektor yang paling sederhana menggunakan sumber eksitasi dari merkuri dengan satu atau lebih filter untuk mengisolasi sebuah berkas dari radiasi emisi. Alat yang lebih modern lagi menggunakan sumber xenon dengan memanfaatkan *grating monochromator* untuk mengisolasi radiasi fluoresensi. Perkembangan selanjutnya pada detektor mungkin akan menggunakan sinar laser yang akan meningkatkan sensitifitas dan selektifitas (21).

Detektor fluoresensi sensitif terhadap senyawa yang secara alami berfluoresensi atau senyawa yang dapat diubah menjadi derivat berfluoresensi baik dengan merubah struktur kima senyawa maupun dengan *coupling* menggunakan reagen berfluoresensi (14). Beberapa zat yang secara alami dapat berfluoresensi, antara lain riboflavin, piren,  $\beta$ -naftilamin, fenol, piridoksin,  $\beta$ -naftol, asam salisilat, amfetamin, barbiturat, kuinin, tirosin, dan triptofan. Contoh zat yang dapat diubah menjadi derivat yang berfluoresensi adalah tiamin menjadi thiokrom, epinefrin menjadi adrenolutin, dan beberapa asam amino. Oksidasi tiamin oleh  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  akan menghasilkan thiokrom yang akan berfluoresensi biru (22).



Gambar 3: Reaksi oksidasi thiamin menjadi thiokrom

## G. VALIDASI METODE ANALISIS

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (9). Tujuan utama validasi adalah untuk menjamin bahwa metode analisis yang digunakan mampu memberikan hasil yang cermat dan handal sehingga dapat dipercaya. Karakter penampilan metode dinyatakan dalam istilah parameter analisis (23). Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis adalah sebagai berikut:

### 1. Kecermatan (*Accuracy*)

Kecermatan adalah kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai hasil perolehan kembali dari analit yang ditambahkan (9). Ada tiga cara untuk menentukan akurasi, yaitu metode perbandingan terhadap standar acuan, metode simulasi atau *spiked placebo recovery*, dan metode penambahan bahan baku atau *standard addition method*. Cara yang umum digunakan adalah berdasarkan persentase yang didapat dari kurva linier standar. Persen perolehan kembali

dinyatakan sebagai rasio antara hasil kadar yang diperoleh dengan kadar yang sebenarnya. Kriteria cermat diberikan jika hasil analisis memberikan rasio antara 80%-120% (23). Pada percobaan penetapan kecermatan, sedikitnya lima sampel yang mengandung analit dan plasebo yang harus disiapkan dengan kadar antara 50% sampai 150% dari kandungan yang diharapkan (24).

## 2. Keseksamaan (*Precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis. Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel dengan matriks yang homogen (24).

### 3. Selektivitas (*Specificity*)

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan. Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya. Pada metode analisis dengan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui resolusinya ( $R_s$ ) (24). Pemisahan kromatogram yang baik diperoleh bila nilai resolusi lebih besar dari 1,5 (23).

### 4. Linearitas dan Rentang (*Linearity and Range*)

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (24). Linearitas dapat diperoleh dengan mengukur beberapa (minimal 5) konsentrasi standar yang berbeda antara 50-150% dari kadar analit dalam sampel kemudian data diproses dengan menggunakan regresi linier, sehingga dapat diperoleh nilai slope, intersep dan

koefisien korelasi. Koefisien korelasi diatas 0,999 sangat diharapkan untuk suatu metode analisis yang baik (23).

#### 5. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi (24).

#### 6. Ketangguhan (*Ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dll. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode ditentukan dengan menganalisis beningan suatu lot sampel yang homogen dalam labratorium yang berbeda oleh analisis yang berbeda menggunakan kondisi operasi yang berbeda, dan lingkungan yang berbeda tetapi menggunakan prosedur dan parameter uji yang sama. Derajat ketertiruan hasil uji kemudian ditentukan sebagai fungsi dari variabel penentuan. Ketertiruan dapat dibandingkan terhadap keseksamaan penentuan di bawah kondisi normal untuk mendapatkan ukuran ketangguhan

metode. Perhitungannya dilakukan secara statistik menggunakan ANOVA pada kajian kolaboratif yang disusun oleh Youden dan Staine (24).

#### 7. Kekuatan (*Robustness*)

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek pada presisi dan akurasi. Sebagai contoh, perubahan yang dibutuhkan untuk menunjukkan kekuatan prosedur HPLC dapat mencakup (tapi tidak dibatasi) perubahan komposisi organik fase gerak (1%), pH fase gerak ( $\pm 0,2$  unit), dan perubahan temperatur kolom ( $\pm 2-3^{\circ}\text{C}$ ). Perubahan lainnya dapat dilakukan bila sesuai dengan laboratorium. Identifikasi sekurang-kurangnya 3 faktor analisis yang dapat mempengaruhi hasil bila diganti atau diubah (24).

**BAB III**  
**BAHAN DAN CARA KERJA**

**A. ALAT**

1. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Shimadzu) terdiri dari pompa (LC-6A), injektor, kolom (Kromasil) C18 fase terbalik 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0,46 cm), detektor fluoresensi (RF-535), dan pengolah data (C-R4A) pada komputer
2. Spektrofotometer UV-Vis (Jasco V-530)
3. Syringe (Hamilton Co. Nevada)
4. pH meter (Eutech Instrumen pH 510)
5. Timbangan analitik (Ohaus, Acculab)
6. Pengocok homogen (Health)
7. Filter eluen dan sampel (Whatman)
8. Pengaduk ultrasonik (Bronson)
9. Penangas air (LAB-LINE Imperial IV)
10. Homogenizer (Multimix)
11. Termometer (Yenaco)
12. Alat-alat gelas

**B. BAHAN**

1. Thiamin Hidroklorida (Zhongjin, China)
2. Riboflavin (DSM, Jerman)



3. Aquabidestilata (Otsuka)
4. Isobutanol (Merck)
5. Metanol (Merck)
6. Asetonitril (Merck)
7.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Merck)
8.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Brataco)
9.  $\text{K}_3\text{FeCN}_6$  (Merck)
10.  $\text{HCl}$  (Merck)
11.  $\text{NaOH}$  (Mallinckrodt)
12. Kasein (Merck)
13. Laktosa (Brataco)
14. Lemak susu (Orchid)
15. Gula
16. Aluminium foil
17. Sampel susu kental manis (2 buah)

### **C. CARA KERJA**

1. Penetapan Panjang Gelombang Optimum Thiokrom dan Riboflavin

Baku pembanding thiamin hidroklorida dan riboflavin masing-masing ditimbang dengan seksama 25 dan 10 mg. Masing-masing zat dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 mL. Thiamin hidroklorida dilarutkan dengan  $\text{HCl}$  0,1N, kemudian dicukupkan volumenya hingga garis batas sambil dikocok

homogen. Riboflavin dilarutkan dengan 5 mL NaOH 0,2N, dilindungi dari cahaya, segera ditambahkan 1 mL asam asetat glasial, kemudian dicukupkan volumenya dengan aquabidestilata hingga garis batas sambil dikocok homogen. Diperoleh larutan thiamin hidroklorida dengan konsentrasi 250 ppm dan larutan riboflavin dengan konsentrasi 100 ppm. Kemudian masing-masing dilakukan pengenceran dengan HCl 0,1N sehingga diperoleh larutan thiamin hidroklorida dengan konsentrasi 25 ppm dan larutan riboflavin dengan konsentrasi 10 ppm.

Larutan thiamin hidroklorida dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kedalamnya ditambahkan 5 mL larutan  $K_3FeCN_6$  0,04% dalam NaOH 15% dan dikocok homogen selama 10 detik, kemudian ditambahkan 5 mL isobutanol dan dikocok homogen selama 10 detik. Akan terbentuk dua lapisan. Larutan yang digunakan berikutnya adalah larutan thiokrom dalam isobutanol dengan konsentrasi 10 ppm. Masing-masing larutan thiokrom dan riboflavin dibuat kurva serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS dan ditentukan panjang gelombang optimum eksitasi keduanya.

## 2. Optimasi Kondisi Analisis Thiokrom dan Riboflavin

Larutan thiokrom dan riboflavin dengan konsentrasi masing-masing 0,1 dan 0,5 ppm disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ L ke alat KCKT pada panjang gelombang optimum masing-masing dengan menggunakan fase gerak dan

laju alir yang berbeda-beda. Fase gerak yang digunakan adalah kalium dihidrogen fosfat dengan beberapa pH seperti pH 3, 4, 5 dan asetonitril dalam beberapa perbandingan komposisi, yaitu kalium dihidrogen fosfat–asetonitril 80:20 v/v, kalium dihidrogen fosfat–asetonitril 70:30 v/v, kalium dihidrogen fosfat–asetonitril 60:40 v/v, kalium dihidrogen fosfat–asetonitril 50:50 v/v, kalium dihidrogen fosfat–asetonitril 40:60 v/v, kalium dihidrogen fosfat–asetonitril 30:70 v/v. Laju alir yang digunakan 0,5 mL/menit dan 1,0 mL/menit. Kemudian ditentukan pH kalium dihidrogen fosfat, komposisi fase gerak, dan laju alir yang memberikan hasil paling baik sebagai kondisi terpilih. Setelah itu dilihat waktu retensi thiokrom dan riboflavin.

### 3. Uji Pendahuluan

Baku pembanding thiamin hidroklorida dan riboflavin masing-masing ditimbang dengan seksama 25 dan 125 mg. Masing-masing zat dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 mL. Thiamin hidroklorida dilarutkan dengan HCl 0,1N, kemudian dicukupkan volumenya hingga garis batas sambil dikocok homogen. Riboflavin dilarutkan dengan 5 mL NaOH 0,2N, dilindungi dari cahaya, segera ditambahkan 1 mL asam asetat glasial, kemudian dicukupkan volumenya dengan aquabidestilata hingga garis batas sambil dikocok homogen. Diperoleh larutan thiamin hidroklorida dan larutan riboflavin dengan konsentrasi masing-masing 250 dan 1250 ppm. Masing-masing dipipet 10 mL dan dicampur dalam labu ukur 100,0 mL. Kemudian diencerkan

dan dicukupkan hingga garis batas sambil dikocok homogen dengan HCl 0,1N. Diperoleh campuran dengan konsentrasi masing-masing 25 dan 125 ppm. Dilakukan serangkaian pengenceran sehingga diperoleh campuran dengan konsentrasi 0,25 dan 1,25 ppm. Campuran tersebut dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kedalam tabung reaksi ditambahkan 5 mL larutan  $K_3FeCN_6$  0,04% dalam NaOH 15% dan dikocok homogen selama 10 detik, kemudian ditambahkan 5 mL isobutanol dan dikocok homogen selama 10 detik. Akan diperoleh campuran thiokrom dan riboflavin dalam isobutanol dengan konsentrasi 0,1 dan 0,5 ppm.

Larutan thiokrom dengan konsentrasi 0,1 ppm, larutan riboflavin dalam isobutanol dengan konsentrasi 0,5 ppm, campuran thiamin hidroklorida dan riboflavin dalam isobutanol dengan konsentrasi 0,1 dan 0,5 ppm, masing-masing disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ L ke alat KCKT pada panjang gelombang optimum thiokrom dengan kondisi terpilih dan dicatat area serta waktu retensinya. Larutan thiokrom dengan konsentrasi 0,1 ppm, larutan riboflavin dalam isobutanol dengan konsentrasi 0,5 ppm, larutan riboflavin dalam HCl 0,1N dengan konsentrasi 0,5 ppm, campuran thiamin hidroklorida dan riboflavin dalam HCl 0,1N dengan konsentrasi 0,1 dan 0,5 ppm, masing-masing disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ L ke alat KCKT pada panjang gelombang optimum riboflavin dengan kondisi terpilih dan dicatat area serta waktu retensinya. Dari semua hasil dibandingkan beberapa hal berikut, apakah thiokrom dapat terdeteksi pada panjang gelombang riboflavin, apakah riboflavin terdeteksi pada panjang gelombang thiokrom, apabila terdeteksi

apakah campuran mengganggu serapan thiokrom atau riboflavin tunggal tersebut.

#### 4. Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Linearitas Thiokrom dan Riboflavin

Baku pembanding thiamin hidroklorida dan riboflavin masing-masing ditimbang dengan seksama 25 dan 10 mg. Masing-masing zat dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 mL. Thiamin hidroklorida dilarutkan dengan HCl 0,1N, kemudian dicukupkan volumenya hingga garis batas sambil dikocok homogen. Riboflavin dilarutkan dengan 5 mL NaOH 0,2N, dilindungi dari cahaya, segera ditambahkan 1 mL asam asetat glasial, kemudian dicukupkan volumenya dengan aquabidestilata hingga garis batas sambil dikocok homogen. Diperoleh larutan thiamin hidroklorida dengan konsentrasi 250 ppm dan larutan riboflavin dengan konsentrasi 100 ppm. Kemudian masing-masing dilakukan pengenceran dengan HCl 0,1N sehingga diperoleh larutan thiamin hidroklorida dengan konsentrasi 2,5 ppm dan larutan riboflavin dengan konsentrasi 1 ppm. Larutan ini selanjutnya disebut larutan induk. Dari larutan induk dilakukan serangkaian pengenceran sehingga diperoleh larutan thiamin hidroklorida dengan konsentrasi 0,125; 0,175; 0,2; 0,25; 0,5; 0,75 ppm dan riboflavin dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,5; 0,7; 0,9; 1 ppm.

Masing-masing larutan thiamin hidroklorida dipipet sebanyak 2 mL dan masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kedalam masing-masing tabung reaksi ditambahkan 5 mL larutan  $K_3FeCN_6$  0,04% dalam

NaOH 15% dan dikocok homogen selama 10 detik, kemudian ditambahkan 5 mL isobutanol dan dikocok homogen selama 10 detik. Akan diperoleh larutan thiokrom dalam isobutanol dengan konsentrasi 0,05; 0,07; 0,08; 0,1; 0,2; dan 0,3 ppm. Masing-masing larutan thiokrom dan riboflavin disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ L ke alat KCKT dengan kondisi terpilih. Kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi dengan serapan untuk thiokrom dan riboflavin sehingga diperoleh persamaan regresi linier.

#### 5. Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Analisis Thiokrom dan Riboflavin

Batas deteksi dan batas kuantitasi thiokrom dan riboflavin dihitung secara statistik melalui persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi yang diperoleh.

#### 6. Uji Presisi Thiokrom dan Riboflavin

Dari masing-masing larutan induk dilakukan serangkaian pengenceran sehingga diperoleh larutan thiamin hidroklorida 0,125; 0,25; 0,75 ppm dan larutan riboflavin 0,2; 0,5; 1 ppm. Masing-masing larutan thiamin hidroklorida dipipet sebanyak 2 mL dan masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kedalam masing-masing tabung reaksi ditambahkan 5 mL larutan  $K_3FeCN_6$  0,04% dalam NaOH 15% dan dikocok homogen selama 10 detik, kemudian ditambahkan 5 mL isobutanol dan dikocok homogen selama 10 detik. Akan diperoleh larutan thiokrom dalam isobutanol dengan konsentrasi

0,05; 0,1; dan 0,3 ppm. Masing-masing larutan thiokrom dan riboflavin disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ L ke alat KCKT dengan kondisi terpilih. Prosedur ini dilakukan sebanyak enam kali dan dihitung koefisien variasinya.

#### 7. Uji Perolehan Kembali Thiamin Hidroklorida yang Dianalisis sebagai Thiokrom dan Riboflavin

Dari masing-masing larutan induk dilakukan serangkaian pengenceran sehingga diperoleh larutan thiamin hidroklorida dengan konsentrasi 48, 60, 72 ppm dan larutan riboflavin dengan konsentrasi 20, 25, 30 ppm. Ditimbang dengan seksama 2,35 g mentega, 2,27 g kasein, 12,8 g gula, dan 3 g laktosa. Kasein, gula, dan laktosa masing-masing dilarutkan dalam air. Ketiganya dicampur dan airnya diuapkan dengan penangas air pada suhu 70°C sampai diperoleh bobot 25,65 g. Mentega dalam cawan penguap dipanaskan dengan penangas air sampai mencair. Mentega cair dalam keadaan panas ditambahkan ke dalam campuran kasein, gula dan laktosa dalam keadaan panas dan segera dihomogenkan. Campuran ini selanjutnya disebut dengan matriks susu. Matriks susu ditimbang dengan seksama 9 g sebanyak tiga kali. Matriks susu pertama ditambahkan 1 mL larutan thiamin hidroklorida 48 ppm dan 1 mL larutan riboflavin 20 ppm. Matriks susu kedua ditambahkan 1 mL larutan thiamin hidroklorida 60 ppm dan 1 mL larutan riboflavin 25 ppm. Matriks susu ketiga ditambahkan 1 mL larutan thiamin hidroklorida 72 ppm dan 1 mL larutan riboflavin 30 ppm. Masing-masing matriks susu ditambahkan 23 mL HCl 0,1N dan dihidrolisis dalam penangas

air pada suhu 100°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan pada suhu kamar dan pH diatur menjadi 4 - 4,5.

Masing-masing matriks susu yang telah ditambahkan analit tersebut dipindahkan secara kuantitatif ke labu ukur 50,0 mL, dicukupkan volumenya sambil dikocok homogen dengan aquabidestilata dan disaring dengan Whatman 41. Masing-masing filtrat langsung disuntikkan sebanyak 20 µL ke alat KCKT dengan kondisi terpilih untuk analisis riboflavin. Masing-masing filtrat dipipet sebanyak 4 mL dan dicukupkan volumenya sampai 10 mL sambil dikocok homogen. Sebanyak 2 mL dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kedalam setiap tabung reaksi ditambahkan 5 mL larutan  $K_3FeCN_6$  0,04% dalam NaOH 15% dan dikocok homogen selama 10 detik, kemudian ditambahkan 5 mL isobutanol dan dikocok homogen selama 10 detik. Masing-masing diambil larutan isobutanolnya dan disuntikkan sebanyak 20 µL ke alat KCKT dengan kondisi terpilih. Analisis dilakukan sebanyak tiga kali. Kadar perolehan kembali thiamin hidroklorida dan riboflavin dihitung dengan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi yang diperoleh.

#### 8. Analisis Kuantitatif Thiamin Hidroklorida yang Dianalisis sebagai Thiokrom dan Riboflavin dalam Susu Kental Manis

Sampel 1 ditimbang dengan seksama 9 g dan sampel 2 ditimbang dengan seksama 18 g masing-masing dalam beaker glass 50 mL dan dilindungi dari cahaya. Sampel ditambahkan dengan 25 mL HCl 0,1N dan



dihidrolisis dalam penangas air pada suhu 100°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan pada suhu kamar dan pH diatur menjadi 4-4,5. Sampel tersebut dipindahkan secara kuantitatif ke labu ukur 50,0 mL, dicukupkan volumenya sambil dikocok homogen dengan aquabidestilata dan disaring dengan Whatman 41. Sebanyak 20 µL filtrat sampel 1 langsung disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi terpilih untuk analisis riboflavin. Sedangkan filtrat sampel 2 dipipet sebanyak 4 mL, dicukupkan volumenya sampai 10 mL dan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi terpilih untuk analisis riboflavin. Filtrat sampel 1 dipipet 4 mL dan dicukupkan volumenya sampai 10 mL sambil dikocok homogen. Sebanyak 2 mL dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kedalam tabung reaksi ditambahkan 5 mL larutan  $K_3FeCN_6$  0,04% dalam NaOH 15% dan dikocok homogen selama 10 detik, kemudian ditambahkan 5 mL isobutanol dan dikocok homogen selama 10 detik. Diambil larutan isobutanolnya dan disuntikkan sebanyak 20 µL ke alat KCKT dengan kondisi terpilih. Sedangkan sampel 2 langsung dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kedalam tabung reaksi ditambahkan 5 mL larutan  $K_3FeCN_6$  0,04% dalam NaOH 15% dan dikocok homogen selama 10 detik, kemudian ditambahkan 5 mL isobutanol dan dikocok homogen selama 10 detik. Diambil larutan isobutanolnya dan disuntikkan sebanyak 20 µL ke alat KCKT dengan kondisi terpilih. Analisis dilakukan sebanyak tiga kali. Kadar thiamin hidroklorida dan riboflavin dalam sampel dihitung dengan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi yang diperoleh.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. HASIL PERCOBAAN**

##### **1. Panjang Gelombang Optimum Thiokrom dan Riboflavin**

Panjang gelombang optimum thiokrom dalam pelarut isobutanol adalah 369,5 nm. Spektrum serapan thiokrom dapat dilihat pada Gambar 6. Panjang gelombang optimum riboflavin dalam pelarut HCl 0,1N adalah 444 nm. Spektrum serapan riboflavin dapat dilihat pada Gambar 7.

##### **2. Kondisi Analisis Thiokrom dan Riboflavin**

Kondisi analisis thiokrom dan riboflavin menggunakan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4–asetonitril 40:60 v/v dengan laju alir 1,0 mL. Pada kondisi analisis ini thiokrom memiliki waktu retensi 2,706 menit dan riboflavin memiliki waktu retensi 2,683 menit. Kromatogram thiokrom dan riboflavin dapat dilihat pada Gambar 8 dan 13. Data waktu retensi, ukuran efisiensi kolom, jumlah pelat teoritis, faktor ikutan, dan luas segitiga dapat dilihat pada Tabel 6.

### 3. Uji Pendahuluan

Dari hasil uji pendahuluan didapatkan bahwa riboflavin tidak terdeteksi pada panjang gelombang optimum thiokrom dan campuran tidak mempengaruhi serapan thiokrom. Kromatogram perbandingan ketiganya dapat dilihat pada Gambar 8, 9, dan 10. Didapatkan pula hasil pada panjang gelombang optimum riboflavin bahwa thiokrom tidak terdeteksi, riboflavin dalam isobutanol tidak terdeteksi, riboflavin dalam HCl 0,1N terdeteksi, dan campuran dalam HCl 0,1N tidak mempengaruhi serapan riboflavin. Kromatogram perbandingan keempatnya dapat dilihat pada Gambar 11, 12, 13, dan 14.

### 4. Kurva Kalibrasi dan Linearitas Thiokrom dan Riboflavin

Persamaan regresi linier thiokrom adalah  $y = 1242132,1119x + 5597,4547$  dengan  $r = 0,9995$ . Data kurva kalibrasi thiokrom dapat dilihat pada Tabel 7. Persamaan regresi linier riboflavin adalah  $y = 191627,1408x - 5879,8185$  dengan  $r = 0,9994$ . Data kurva kalibrasi riboflavin dapat dilihat pada Tabel 8.

### 5. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Analisis Thiokrom dan Riboflavin

Batas deteksi larutan thiokrom adalah sebesar 0,0074 ppm dan batas kuantitasi larutan thiokrom adalah sebesar 0,0248 ppm. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9. Batas deteksi larutan riboflavin adalah sebesar

0,0258 ppm dan batas kuantitasi larutan riboflavin adalah sebesar 0,0860 ppm. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 10.

#### 6. Uji Presisi Thiokrom dan Riboflavin

Larutan thiokrom dengan konsentrasi 0,3096 ppm memiliki koefisien variasi 1,95%, konsentrasi 0,1032 ppm memiliki koefisien variasi 1,84%, dan konsentrasi 0,0516 ppm memiliki koefisien variasi 1,67%. Data hasil uji presisi thiokrom selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 11. Larutan riboflavin dengan konsentrasi 1,0240 ppm memiliki koefisien variasi 1,67%, konsentrasi 0,5120 ppm memiliki koefisien variasi 0,85%, dan konsentrasi 0,2048 ppm memiliki koefisien variasi 1,74%. Data hasil uji presisi riboflavin selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 12.

#### 7. Uji Perolehan Kembali Thiamin Hidroklorida yang Dianalisis sebagai Thiokrom dan Riboflavin

Hasil perolehan kembali thiamin hidroklorida yang dianalisis sebagai thiokrom pada konsentrasi penambahan 51,6 ppm adalah  $99,16 \pm 0,68\%$ , pada konsentrasi penambahan 61,92 ppm adalah  $99,44 \pm 0,49\%$ , dan pada konsentrasi penambahan 72,24 ppm adalah  $99,20 \pm 0,42\%$ . Data hasil perolehan kembali thiamin hidroklorida dapat dilihat pada Tabel 13. Hasil perolehan kembali riboflavin pada konsentrasi penambahan 20,48 ppm adalah  $99,33 \pm 0,18\%$ , pada konsentrasi penambahan 25,6 ppm adalah

99,63 ± 0,35%, dan pada konsentrasi penambahan 30,72 ppm adalah 99,36 ± 0,31%. Data hasil perolehan kembali riboflavin dapat dilihat pada Tabel 14.

#### 8. Analisis Kuantitatif Thiamin Hidroklorida yang Dianalisis sebagai Thiokrom dan Riboflavin dalam Susu Kental Manis

Kadar rata-rata thiamin hidroklorida yang dianalisis sebagai thiokrom dalam sampel 1 yang dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi adalah  $4,67 \pm 0,91$  ppm ( $69,96 \pm 0,91\%$  dari kadar thiamin hidroklorida yang tertera pada etiket). Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 15. Kadar rata-rata riboflavin dalam sampel 1 yang dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi adalah  $3,00 \pm 0,27$  ppm ( $108,00 \pm 0,27\%$  dari kadar riboflavin yang tertera pada etiket). Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 16. Kadar rata-rata thiamin hidroklorida yang dianalisis sebagai thiokrom dalam sampel 2 yang dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi adalah  $0,62 \pm 0,81$  ppm ( $8,69 \pm 0,81\%$  dari kadar thiamin hidroklorida yang tertera pada etiket). Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 17. Kadar rata-rata riboflavin dalam sampel 2 yang dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi adalah  $3,76 \pm 0,89$  ppm ( $158,07 \pm 0,89\%$  dari kadar riboflavin yang tertera pada etiket). Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 18.

## B. PEMBAHASAN

Pada penelitian kali ini, dilakukan analisis kuantitatif thiamin hidroklorida dan riboflavin dalam susu kental manis menggunakan KCKT

dengan detektor fluoresensi. Riboflavin berfluoresensi secara alami, sedangkan thiamin hidroklorida akan dianalisis sebagai thiokrom dengan mereaksikannya terlebih dahulu dengan  $K_3FeCN_6$  0,04% dalam NaOH 15% dan dilarutkan dalam isobutanol.

### 1. Penentuan Panjang Gelombang Optimum Thiokrom dan Riboflavin

Penelitian dimulai dengan penentuan panjang gelombang optimum thiokrom dan riboflavin dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Penggunaan spektrofotometri UV-Vis untuk pendekatan panjang gelombang eksitasi. Sedangkan panjang gelombang emisi dioptimasi langsung pada alat KCKT dengan referensi jurnal. Dari hasil percobaan (Gambar 6) panjang gelombang optimum untuk thiokrom adalah 369,5 nm dan (Gambar 7) panjang gelombang optimum untuk riboflavin adalah 444 nm. Akan tetapi, panjang gelombang eksitasi thiokrom yang digunakan adalah 370 nm dan untuk riboflavin adalah 445 nm karena keterbatasan skala pada detektor KCKT. Dari hasil optimasi dan referensi, diperoleh panjang gelombang emisi thiokrom 435 nm dan panjang gelombang emisi riboflavin 520 nm.

### 2. Optimasi Kondisi Analisis Thiokrom dan Riboflavin

Setelah mendapatkan panjang gelombang eksitasi dan emisi kedua zat, penelitian dilanjutkan dengan mencari kondisi analisis optimum yang meliputi fase gerak dan laju alir. Dari hasil percobaan, diperoleh fase gerak

kalium dihidrogen fosfat pH 4–asetonitril 40:60 v/v dengan laju alir 1,0 mL/menit. Pada kondisi analisis ini thiokrom memiliki waktu retensi 2,706 menit dan riboflavin memiliki waktu retensi 2,683 menit.

### 3. Uji Pendahuluan

Kondisi optimum selanjutnya digunakan untuk uji pendahuluan untuk mengetahui apakah riboflavin terdeteksi pada panjang gelombang thiokrom dan sebaliknya, serta apakah campuran mempengaruhi analisis suatu zat tunggal. Dari hasil percobaan pada panjang gelombang thiokrom diperoleh bahwa riboflavin dalam pelarut isobutanol tidak terdeteksi dan campuran tidak mempengaruhi serapan thiokrom. Demikian pula pada panjang gelombang riboflavin, thiokrom tidak terdeteksi dan campuran dalam pelarut HCl 0,1N tidak mempengaruhi serapan riboflavin. Dengan kata lain, analisis kedua zat ini harus dilakukan secara terpisah dimana riboflavin langsung dianalisis dalam pelarut HCl 0,1N dan thiamin hidroklorida harus direaksikan terlebih dahulu menjadi thiokrom dalam pelarut isobutanol pada panjang gelombang optimum masing-masing.

### 4. Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Linieritas Thiokrom dan Riboflavin

Setelah diperoleh metode untuk analisis kedua zat, maka dilakukan validasi metode. Validasi metode yang pertama dilakukan adalah kurva kalibrasi dan linieritas. Pada pembuatan kurva kalibrasi dan linieritas

thiokrom, dibuat larutan dengan berbagai konsentrasi yaitu, 0,0516; 0,0722; 0,0826; 0,1032; 0,2064; dan 0,3096 ppm. Masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT dengan volume penyuntikkan 20  $\mu\text{L}$  pada kondisi analisis optimum. Dari data yang diperoleh, didapatkan persamaan regresi linier untuk thiokrom yaitu,  $y = 1242132,1119x + 5597,4547$  dengan koefisien korelasi sebesar 0,9995. Pembuatan kurva kalibrasi dan linieritas riboflavin dilakukan dengan membuat larutan riboflavin dengan berbagai konsentrasi yaitu, 0,2048; 0,4096; 0,5120; 0,7168; 0,9216; 1,0240 ppm. Masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT dengan volume penyuntikkan 20  $\mu\text{L}$  pada kondisi analisis optimum. Dari data yang diperoleh, didapatkan persamaan regresi linier untuk riboflavin yaitu,  $y = 191627,1408x - 5879,8185$  dengan koefisien korelasi 0,9994.

#### 5. Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Analisis Thiokrom dan Riboflavin

Berdasarkan persamaan regresi linier masing-masing zat, dapat dihitung secara statistik batas deteksi dan batas kuantitasi thiokrom dan riboflavin. Konsentrasi terkecil thiokrom yang masih dapat terdeteksi berdasarkan perhitungan adalah 0,0074 ppm, sedangkan konsentrasi terkecil kuantitasi yang masih dapat memenuhi kriteria akurat dan presisi adalah 0,0248 ppm. Konsentrasi terkecil riboflavin yang masih dapat terdeteksi berdasarkan perhitungan adalah 0,0258 ppm, sedangkan konsentrasi terkecil



kuantitasi yang masih dapat memenuhi kriteria akurat dan presisi adalah 0,0860 ppm.

## 6. Uji Presisi Thiokrom dan Riboflavin

Setelah diperoleh persamaan regresi untuk thiokrom dan riboflavin, dilakukan uji presisi. Uji presisi thiokrom dilakukan dengan membuat tiga larutan thiokrom dengan konsentrasi yang berbeda yaitu, 0,3096; 0,1032; dan 0,0516 ppm. Masing-masing larutan ini disuntikkan ke alat KCKT dengan volume penyuntikkan 20  $\mu$ L pada kondisi analisis optimum. Prosedur ini dilakukan sebanyak enam kali. Masing-masing hasil penyuntikkan pada konsentrasi yang sama dihitung koefisien variasinya. Dari data diperoleh bahwa larutan thiokrom dengan konsentrasi 0,3096 ppm memiliki koefisien variasi 1,95%, larutan thiokrom dengan konsentrasi 0,1032 ppm memiliki koefisien variasi 1,84%, dan larutan thiokrom dengan konsentrasi 0,0516 ppm memiliki koefisien variasi 1,67%.

Selanjutnya dilakukan uji presisi untuk larutan riboflavin. Seperti thiokrom, uji presisi riboflavin dilakukan dengan membuat tiga larutan dengan konsentrasi yang berbeda-beda yaitu, 1,0240; 0,5120; dan 0,2048 ppm. Masing-masing larutan ini disuntikkan ke alat KCKT dengan volume penyuntikkan 20  $\mu$ L pada kondisi analisis optimum. Prosedur ini dilakukan sebanyak enam kali. Masing-masing hasil penyuntikkan pada konsentrasi yang sama dihitung koefisien variasinya. Dari data diperoleh bahwa larutan

riboflavin dengan konsentrasi 1,0240 ppm memiliki koefisien variasi 1,67%, larutan riboflavin dengan konsentrasi 0,5120 ppm memiliki koefisien variasi 0,85%, dan larutan riboflavin dengan konsentrasi 0,2048 ppm memiliki koefisien variasi 1,74%.

#### 7. Uji Perolehan Kembali Thiamin Hidroklorida yang Dianalisis sebagai Thiokrom dan Riboflavin

Setelah didapatkan hasil uji presisi, validasi dilanjutkan dengan uji perolehan kembali thiamin hidroklorida yang dianalisis sebagai thiokrom dan riboflavin. Uji perolehan kembali yang dilakukan adalah metode plasebo, yaitu dengan menambahkan baku pembanding ke dalam matriks susu yang dibuat sendiri. Oleh karena itu, terlebih dahulu dibuat matriks susu yang terdiri dari laktosa, lemak, gula, protein susu (kasein), dan air. Komposisi masing-masing bahan disesuaikan dengan literatur dan etiket yang tertera pada kemasan susu. Setelah matriks susu dihomogenkan, segera ditimbang dengan seksama 9 g sebanyak 3 kali sebelum memisah.

Matriks yang dihasilkan memisah karena keterbatasan waktu untuk optimasi dan belum ada literatur sebagai acuan untuk membuat susu. Susu yang beredar di pasaran diolah dari susu murni hasil laktasi hewan perah yang secara alami mengandung thiamin hidroklorida dan riboflavin. Oleh karena itu, untuk uji perolehan kembali perlu dibuat plasebo yang menyerupai matriks susu. Salah satu faktor yang membuat matriks memisah adalah tidak semua zat yang terdapat dalam susu digunakan, tetapi hanya bahan utama

penyusun susu. Misalnya protein susu sebagai emulgator, terdiri dari kasein, albumin, dan beberapa protein lain yang terdapat dalam jumlah kecil. Pada percobaan ini hanya digunakan kasein karena jumlahnya yang mayoritas dibandingkan lainnya. Penyebab lainnya, kasein dalam susu berupa misel kasein yang sampai saat ini para peneliti belum mengetahui proses pembentukannya, sedangkan penelitian ini menggunakan kasein murni.

Untuk uji perolehan kembali, dibuat larutan dengan tiga konsentrasi yang berbeda, yakni 80%, 100%, dan 120%. Larutan thiamin hidroklorida yang digunakan adalah 51,6; 61,92; dan 72,24 ppm, sedangkan larutan riboflavin yang digunakan adalah 20,48; 25,6; dan 30,72 ppm. Masing-masing larutan dimasukkan sebanyak 1 mL ke dalam matriks susu yang sudah ditimbang dengan seksama dan diekstraksi. Ekstraksi yang digunakan sama dengan ekstraksi untuk sampel. Matriks susu atau susu ditambahkan dengan HCl 0,1N dan dihidrolisis pada suhu 100°C dalam penangas air selama 30 menit. Kemudian pH diatur menjadi 4-4,5 dan dicukupkan volumenya. Setelah disaring, riboflavin dapat langsung disuntikkan ke alat KCKT dengan volume penyuntikkan 20 µL pada kondisi analisis optimum. Sedangkan thiamin hidroklorida direaksikan terlebih dahulu menjadi thiokrom dalam pelarut isobutanol dan disuntikkan sebanyak 20 µL pada kondisi analisis optimum. Dari hasil percobaan, perolehan kembali ketiga konsentrasi baik thiamin hidroklorida maupun riboflavin mencapai 99% dengan koefisien variasi di bawah 2%.

## 8. Analisis Kuantitatif Thiamin Hidroklorida yang Dianalisis sebagai Thiokrom dan Riboflavin dalam Susu Kental Manis

Setelah validasi metode memenuhi persyaratan, dilakukan penetapan kadar thiamin hidroklorida dan riboflavin dalam susu kental manis. Pada etiket sampel 1, dikatakan bahwa tiap takaran saji (45 g) mengandung 30% AKG vitamin B<sub>1</sub> dan 10% AKG vitamin B<sub>2</sub>. Dengan kata lain, setiap g mengandung 6,67 µg thiamin hidroklorida dan 2,78 µg riboflavin. Dari percobaan, diperoleh kadar thiamin hidroklorida  $4,67 \pm 0,91$  ppm ( $69,96 \pm 0,91\%$  dari yang tertera pada etiket) dan kadar riboflavin  $3,00 \pm 0,27$  ppm ( $108,00 \pm 0,27\%$  dari yang tertera pada etiket). Pada etiket sampel 2, dikatakan bahwa tiap takaran saji (42 g) mengandung 0,3 mg (30% AKG) vitamin B<sub>1</sub> dan 0,1 mg (8% AKG) vitamin B<sub>2</sub>. Dengan kata lain, setiap g mengandung 7,14 µg thiamin hidroklorida dan 2,38 µg riboflavin. Dari percobaan, diperoleh kadar thiamin hidroklorida  $0,62 \pm 0,81$  ppm ( $8,69 \pm 0,81\%$  dari kadar yang tertera pada etiket) dan kadar riboflavin  $3,76 \pm 0,89$  ppm ( $158,07 \pm 0,89\%$  dari yang tertera pada etiket). Kadar riboflavin yang berlebih dari yang tertera pada etiket dikarenakan susu murni secara alami sudah mengandung riboflavin.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. KESIMPULAN**

1. Kondisi optimum metode kromatografi cair kinerja tinggi untuk analisis kuantitatif thiamin hidroklorida dan riboflavin dalam susu kental manis menggunakan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, panjang gelombang eksitasi dan emisi thiokrom berturut-turut 370 nm dan 435nm, panjang gelombang eksitasi dan emisi riboflavin berturut-turut 445 nm dan 520 nm. Metode ini memenuhi syarat parameter-parameter validasi yang ditetapkan.
2. Kadar thiamin hidroklorida dan riboflavin pada sampel 1 berturut-turut adalah  $4,67 \pm 0,91$  ppm ( $69,96 \pm 0,91\%$ ) dan  $3,00 \pm 0,27$  ppm ( $108,00 \pm 0,27\%$ ), sedangkan pada sampel 2 adalah  $0,62 \pm 0,81$  ppm ( $8,69 \pm 0,81\%$ ) dan  $3,76 \pm 0,89$  ppm ( $158,07\% \pm 0,89\%$ ).

#### **B. SARAN**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pembuatan plasebo untuk uji perolehan kembali thiamin hidroklorida dan riboflavin dalam susu kental manis secara kromatografi cair kinerja tinggi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk analisis vitamin dan mineral lain dalam susu kental manis.

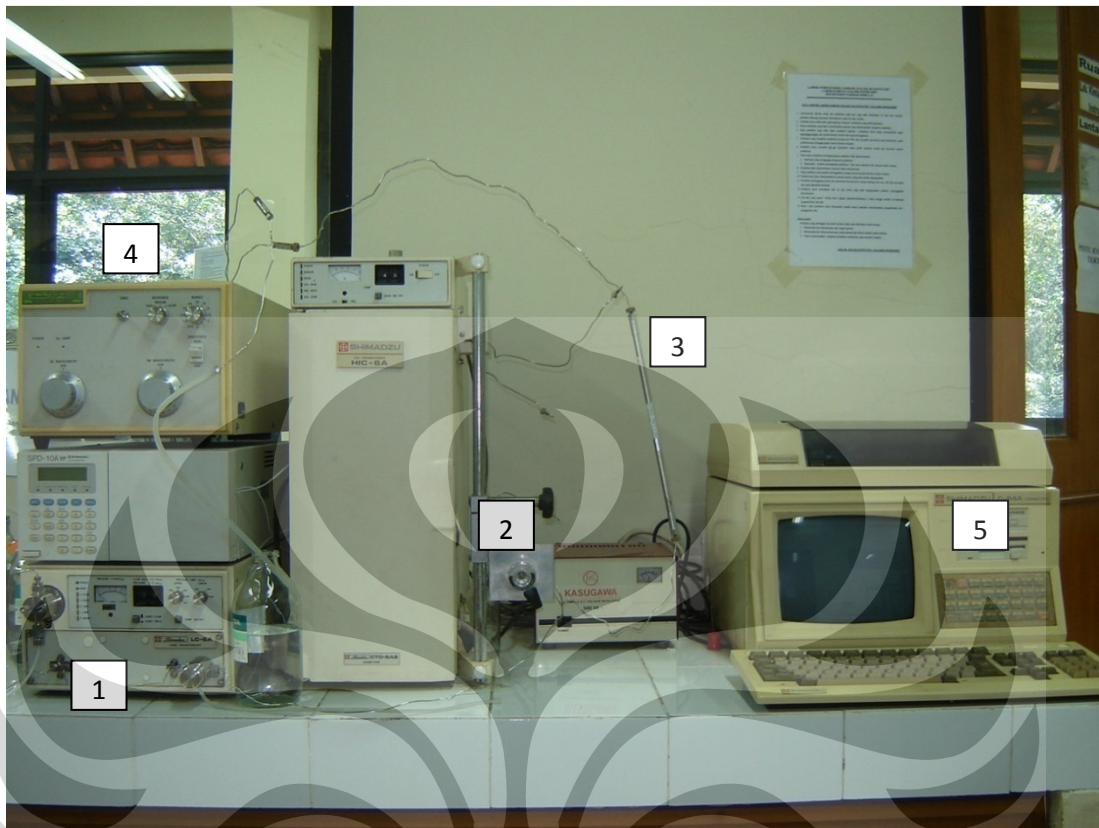
## DAFTAR ACUAN

1. Widodo. 2003. *Teknologi Proses Susu Bubuk*. Lacticia Press. Yogyakarta: 1-2
2. Kurniasih, Dedeh, Gazalih Solahuddin. 2008. *Edisi Tematis Susu Tepat, Anak Sehat*. <http://www.tabloid-nakita.com/Khasanah.htm>. 26 Desember 2008, pk. 12.10
3. Widodo. 2003. *Bioteknologi Industri Susu*. Lacticia Press. Yogyakarta: 5-22
4. Galichet, Laurent Y. 2005. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Pharmaceutical Press. London: 959,1014
5. Horwitz, William, George W. Latimer, Jr. 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International* edisi 18. AOAC International. USA: bab 45 hal. 9-15
6. Nollet, Leo M.L. ed. 1992. *Food Analysis by HPLC*. Marcel Dekker, Inc. New York: 343 – 362
7. Ponder, E. L., B. Fried, J. sherma. 2004. Thin-Layer Chromatographic Analysis of Hydrophilic Vitamins in Standards and from *Helisoma trivolvis* Snails. *Acta Chromatographica* **14**: 73,76
8. Hashmi, Manzur UI Haque. 1972. *Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations*. John Wiley & Sons. New York: 50
9. Harmita. 2006. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Departemen farmasi FMIPA UI. Depok: 115 -127, 144
10. Triebold, Howard O., Leonard W Aurand. 1963. *Food Composition and Analysis*. D. Van Nostrand Company, Inc. New York: 316
11. Anonim. 1978. *Farmakope Indonesia* edisi III. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta: 557, 598
12. Anonim. 1995. *Farmakope indonesia* edisi IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta: 741, 784
13. James E. F. Reynolds, ed. 1982. *Martindale* edisi 28. The Pharmaceutical Press. London: 1639, 1641-1642

14. Anonim. 2006. *United State of Pharmacopoeia* volume 31. The United State Pharmacopoeial Convention. USA: 182-185, 232-243, 3178-3179, 3381-3382
15. Hassan, Rusepno, Husein Alatas, ed. 1985. *Ilmu Kesehatan Anak*. Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UI. Jakarta: 347-349
16. Anonim. 2002. *Human Vitamin and Mineral Requirements*. <http://www.fao.org/docrep/004/y2809e/y2809e09.htm#bm09.1>. 5 November 2008, pk. 10.25
17. Lawrance, Paul. 2007. Analytical Procedures for The Determination of Vitamins B<sub>1</sub> & B<sub>2</sub> in Foods, Feeds and Supplements. *LGC* **19**: 18-20
18. Furlani, Regina Prado Zanes, Helena Texeira Godoy. 2007. Vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> Contents in Cultivated Mushrooms. *ACS* **106**: 816-819
19. Ndaw, S., et al. 2000. Extraction Procedures for The Liquid Chromatographic Determination of Thiamin, Riboflavin and Vitamin B<sub>6</sub> in Foodstuffs. *ACS* **71**: 129-138
20. Barna, Dworschak. 1994. Determination of Thiamine (Vitamin B<sub>1</sub>) and Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) in Meat and Liver by High-Performance Liquid Chromatography. *IBIDS* **668** (2): 359 - 363
21. Skoog, Douglas A., James J. Leary. 1971. *Principles of Instrumental Analysis* edisi 4. Saunders College Publishing. USA: 628-641
22. Day, Jr., R. A., A. L. Underwood. 1989. *Analisis Kimia Kuantitatif* edisi 5. Terj. dari *Quantitative Analysis* edisi 5, oleh Aloysius Hadyana Pudjaatmaka. Erlangga. Jakarta: 449
23. Harmita. 2006. *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi* edisi 1. Departemen Farmasi FMIPA UI. Depok: 157-168
24. Harmita. 2006. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Departemen Farmasi FMIPA UI. Depok: 1-35



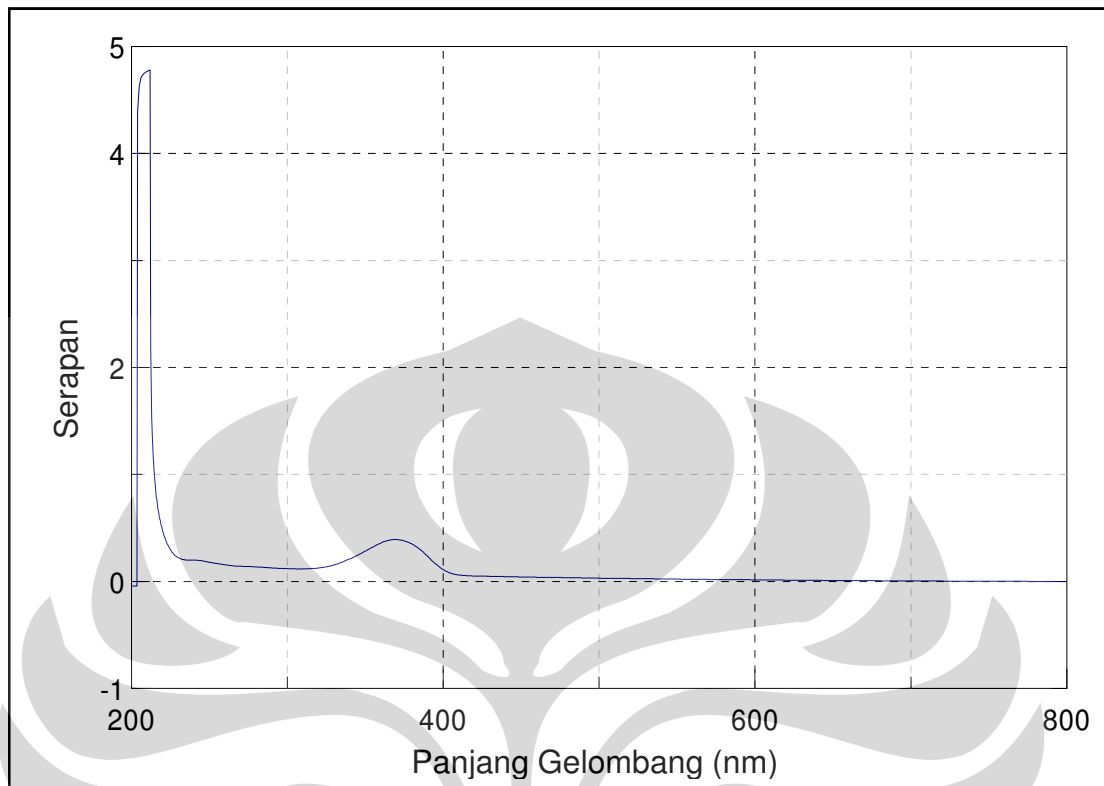




Gambar 4: Alat kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu) terdiri dari (1) pompa, (2) injektor, (3) kolom (Kromasil) C18 fase terbalik  $5\mu\text{m}$  ( $25 \times 0,46 \text{ cm}$ ), (4) detektor fluoresensi, dan (5) pengolah data (C-R4A) pada komputer



Gambar 5: Alat spektrofotometer UV-Vis (Jasco V-530)

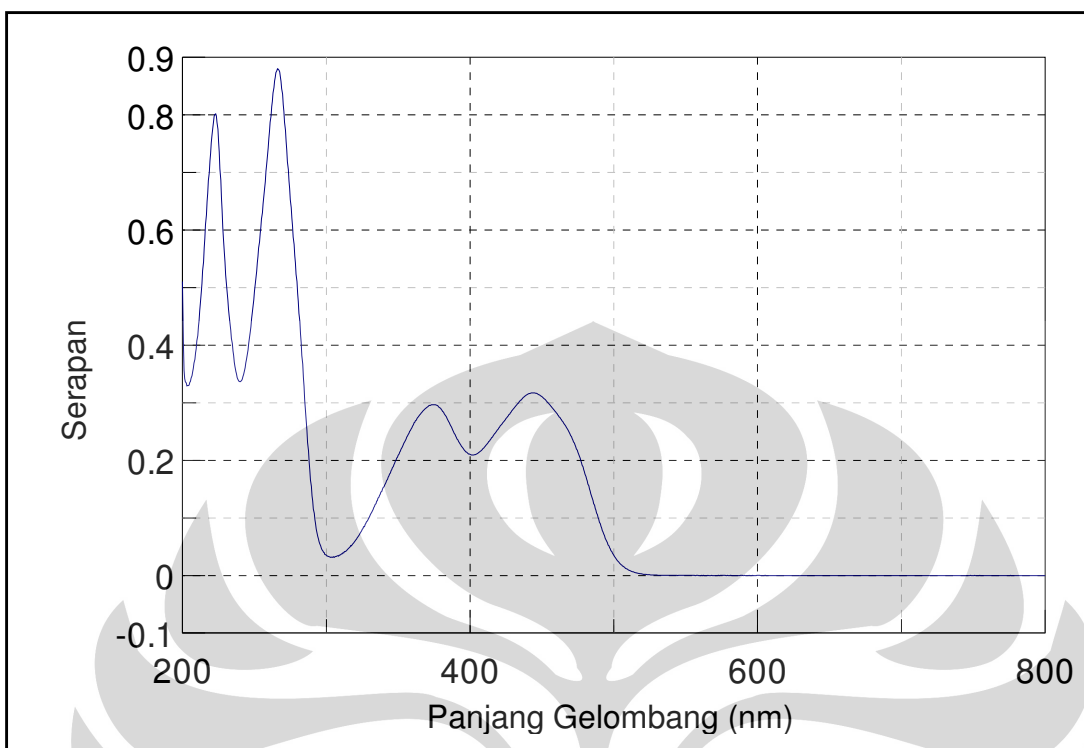


Gambar 6: Spektrum serapan thiokrom 10,32 ppm dalam pelarut isobutanol

Keterangan:

Panjang gelombang eksitasi maksimum thiokrom : 369,5 nm

Serapan : 0,39282

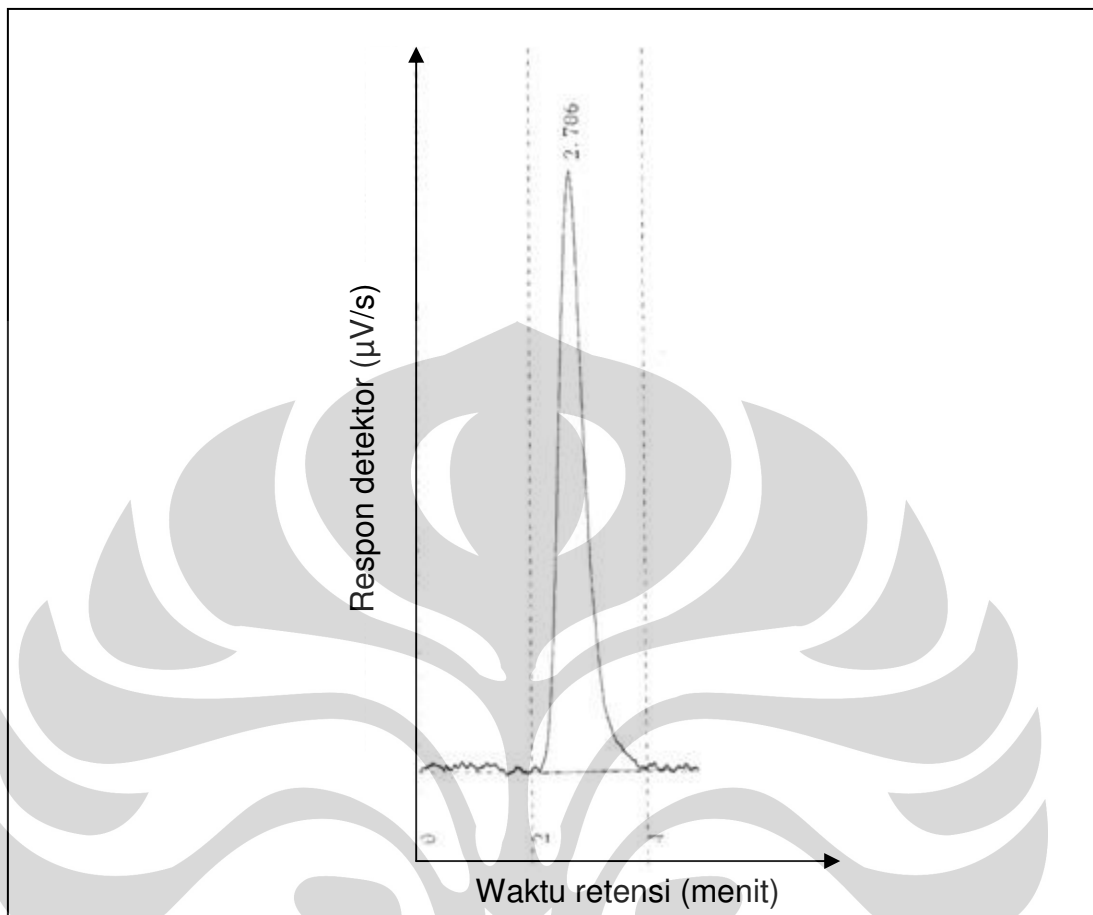


Gambar 7: Spektrum serapan riboflavin 10,14 ppm dalam pelarut HCl 0,1N

Keterangan:

Panjang gelombang eksitasi maksimum riboflavin : 444 nm

Serapan : 0,31719



Gambar 8: Kromatogram thiokrom 0,1016 ppm dalam pelarut isobutanol dengan kondisi optimum thiokrom

Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20 µL

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

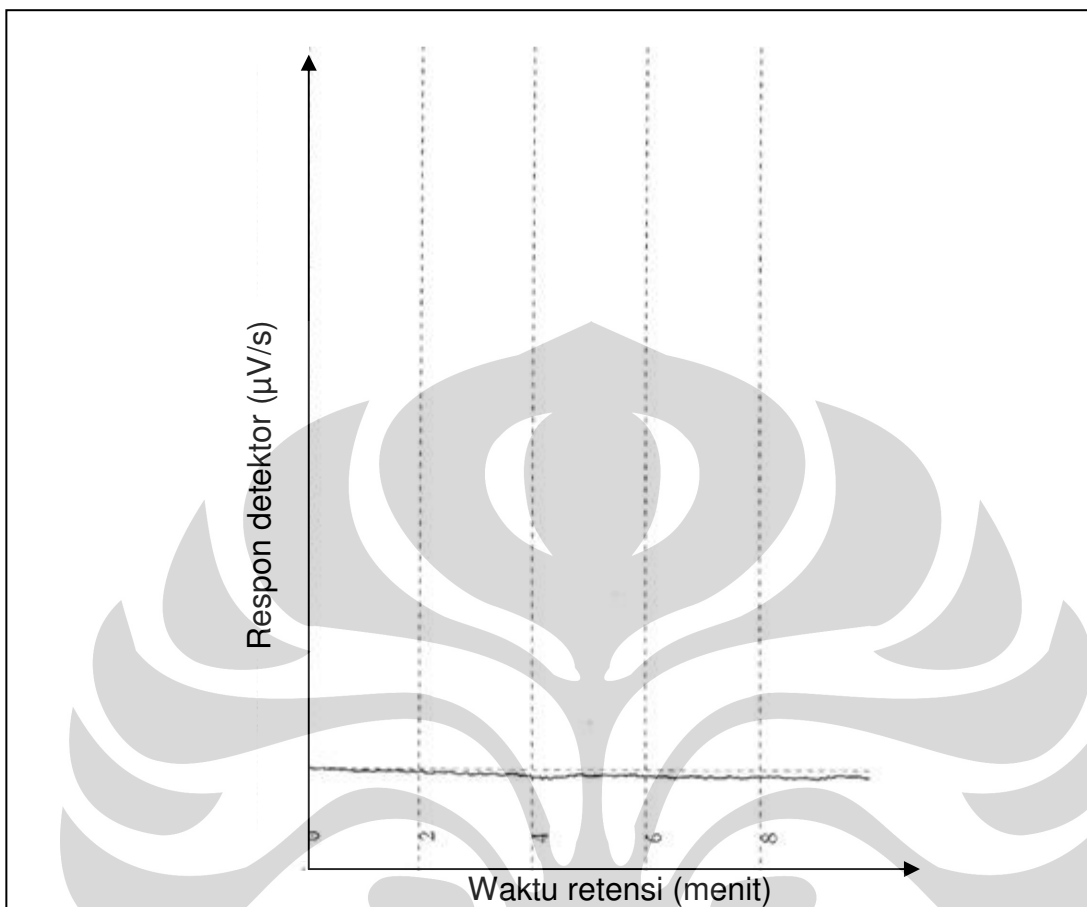
laju alir : 1,0 mL/menit

detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370 \text{ nm}$        $\lambda_{\text{emisi}} = 435 \text{ nm}$

Keterangan:

Waktu retensi : 2,706 menit

Area : 296957 µV/s



Gambar 9: Kromatogram baku pembanding riboflavin 0,596 ppm dalam pelarut isobutanol dengan kondisi optimum thiokrom

Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20 µL

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

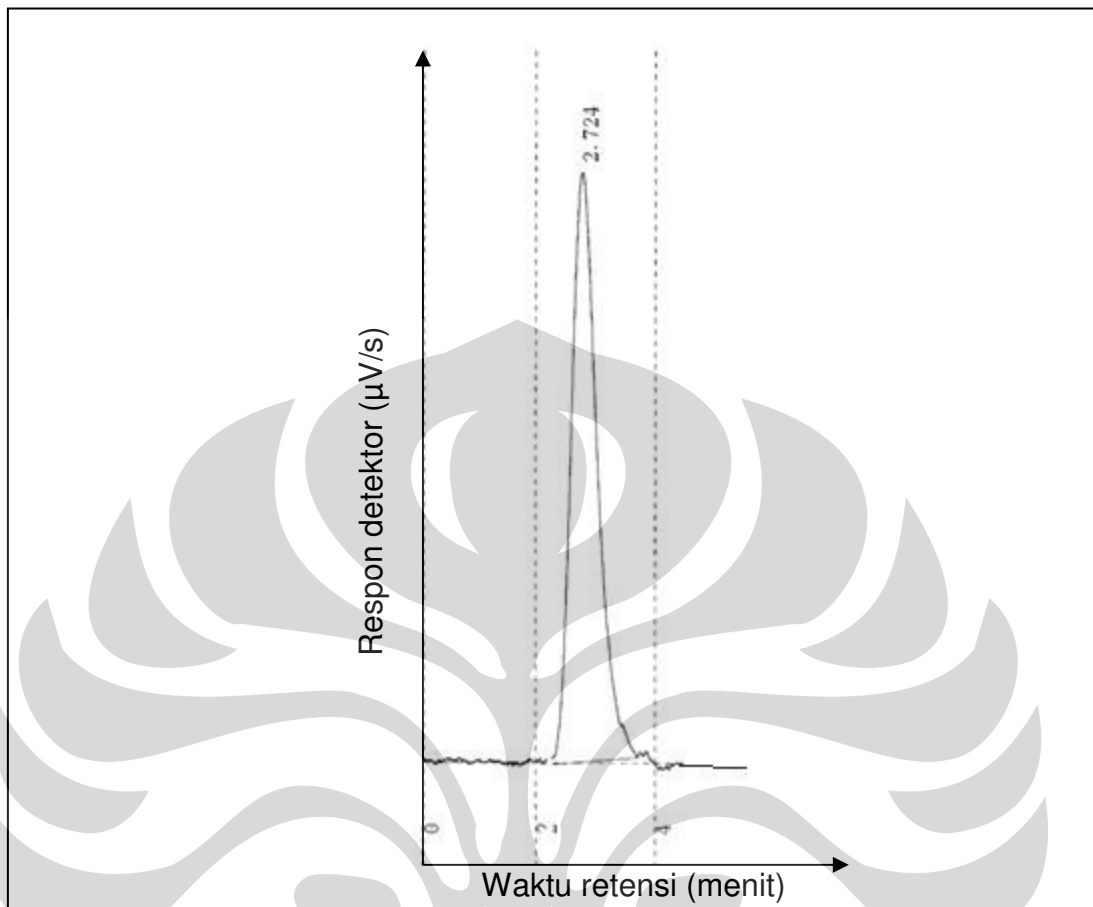
laju alir : 1,0 mL/menit

detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 435 \text{ nm}$

Keterangan:

Waktu retensi : -

Area : 0



Gambar 10: Kromatogram campuran thiokrom 0,1016 ppm dan riboflavin 0,516 ppm dalam pelarut isobutanol dengan kondisi optimum thiokrom

Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20  $\mu$ L

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

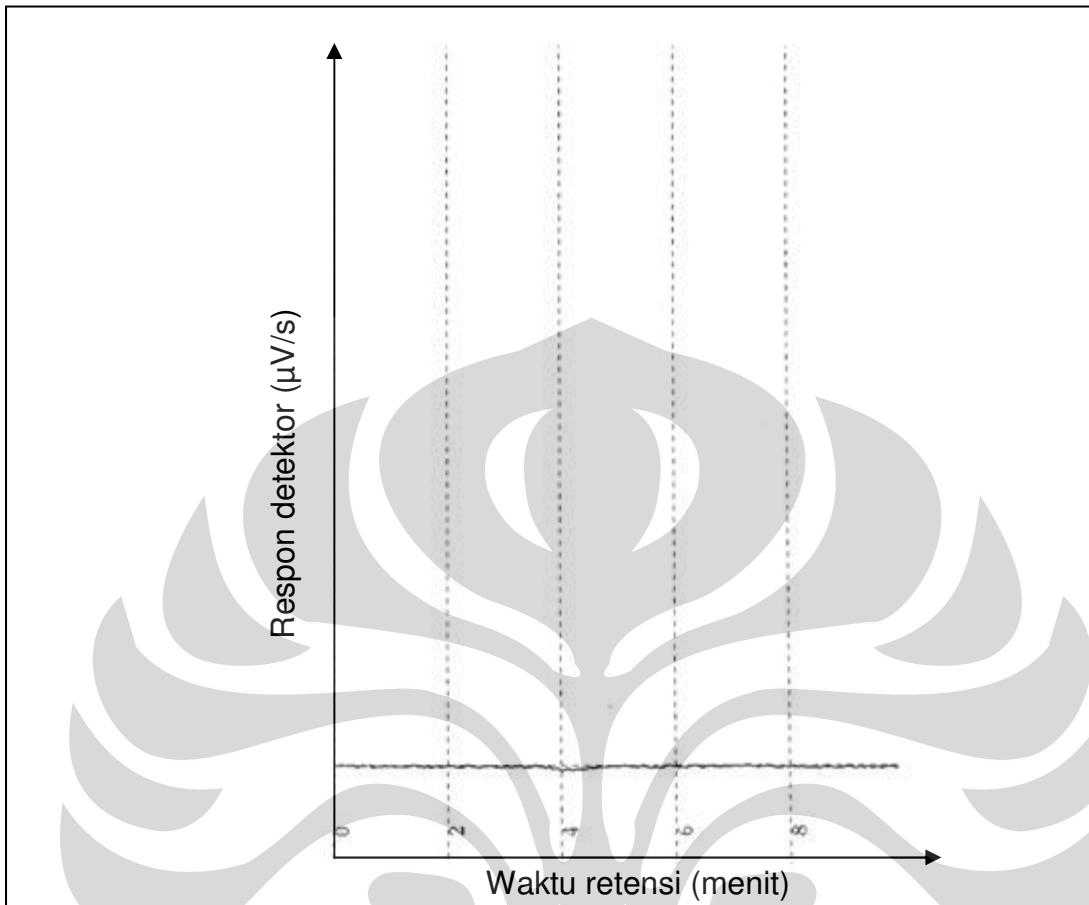
laju alir : 1,0 mL/menit

detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 435 \text{ nm}$

Keterangan:

Waktu retensi : 2,724 menit

Area : 289228  $\mu$ V/s



Gambar 11: Kromatogram thiokrom 0,1016 ppm dalam pelarut isobutanol dengan kondisi optimum riboflavin

Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20  $\mu$ L

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

laju alir : 1,0 mL/menit

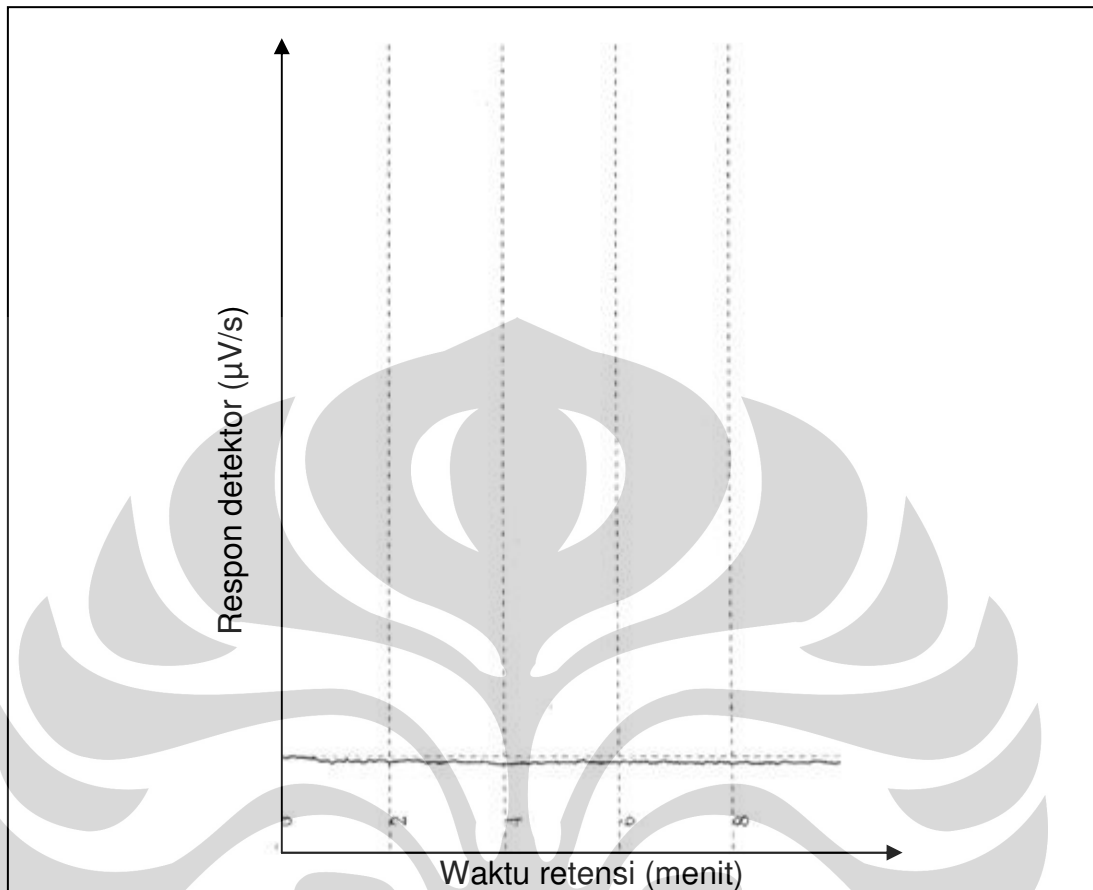
detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 520 \text{ nm}$

Keterangan:

Waktu retensi : -

Area : 0





Gambar 12: Kromatogram baku pembanding riboflavin 0,596 ppm dalam pelarut isobutanol dengan kondisi optimum riboflavin

Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20  $\mu$ L

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

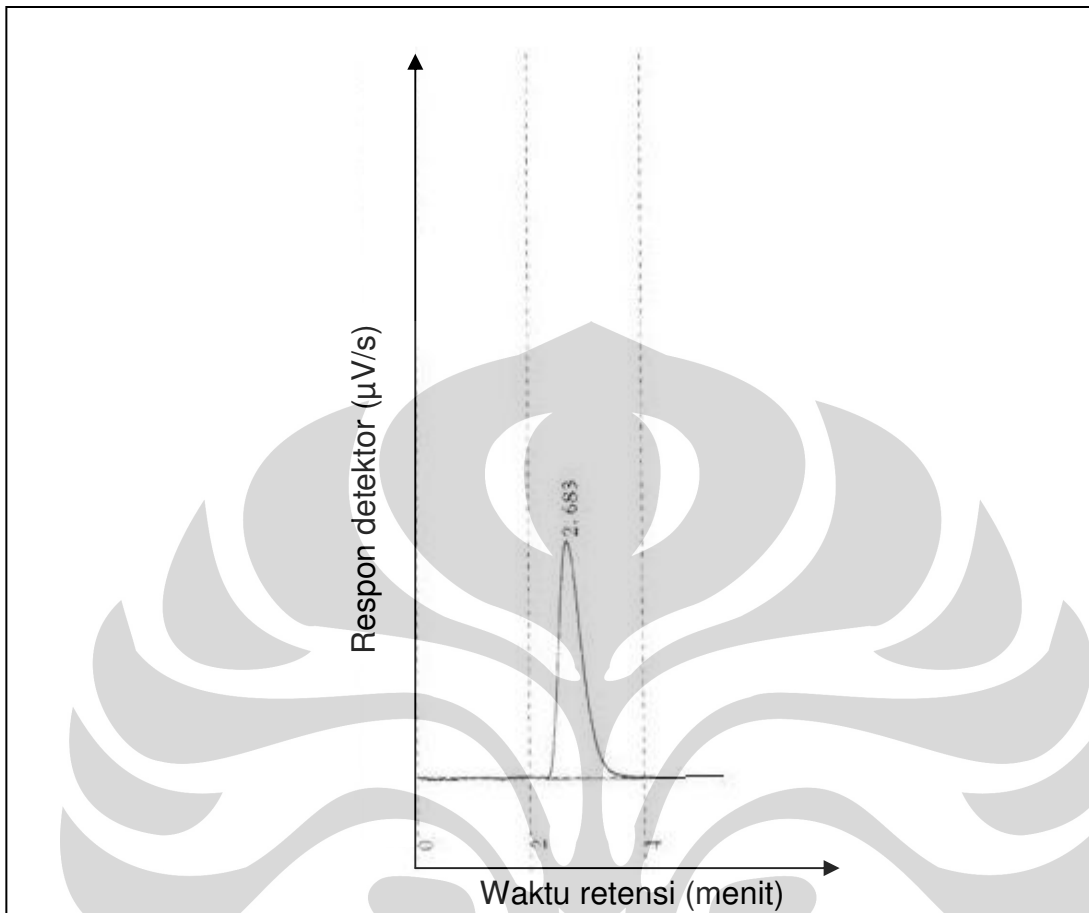
laju alir : 1,0 mL/menit

detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 520 \text{ nm}$

Keterangan:

Waktu retensi : -

Area : 0



Gambar 13: Kromatogram baku pembanding riboflavin 0,596 ppm dalam pelarut HCl 0,1N dengan kondisi optimum riboflavin

Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20  $\mu$ L

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

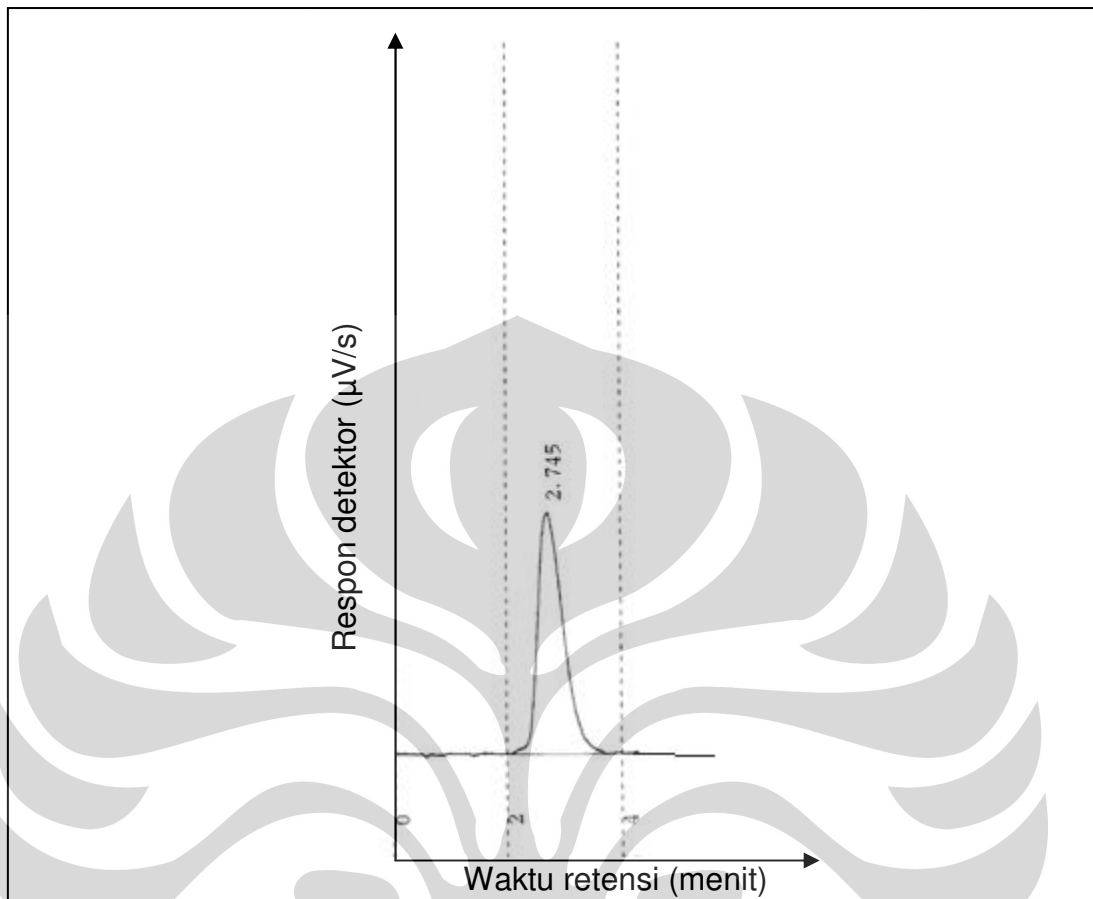
laju alir : 1,0 mL/menit

detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 520 \text{ nm}$

Keterangan:

Waktu retensi : 2,683 menit

Area : 104773  $\mu$ V/s



Gambar 14: Kromatogram campuran thiokrom 0,1016 ppm dan riboflavin 0,596 ppm dalam pelarut HCl 0,1N dengan kondisi optimum riboflavin

Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20 µL

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

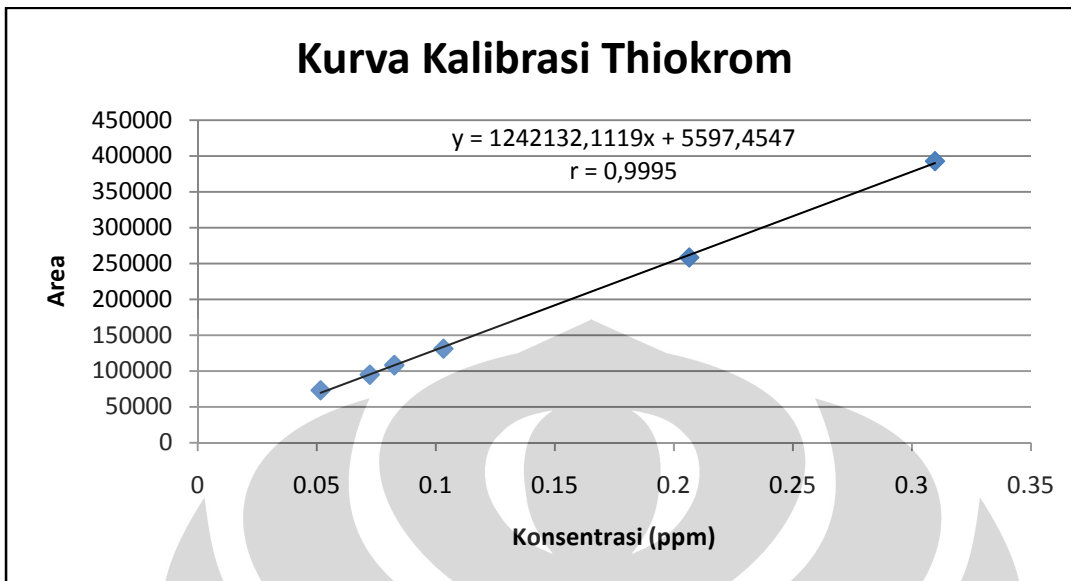
laju alir : 1,0 mL/menit

detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 520 \text{ nm}$

Keterangan:

Waktu retensi : 2,745 menit

Area : 115527 µV/s



Gambar 15: Kurva kalibrasi thiokrom

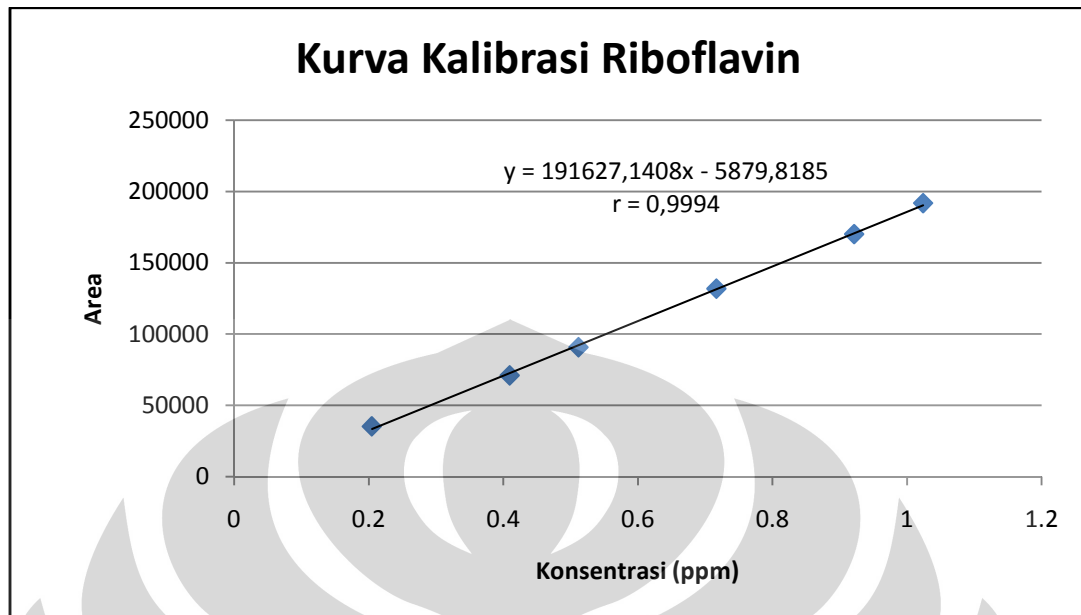
Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20  $\mu$ L

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

laju alir : 1,0 mL/menit

detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 435 \text{ nm}$



Gambar 16: Kurva kalibrasi riboflavin

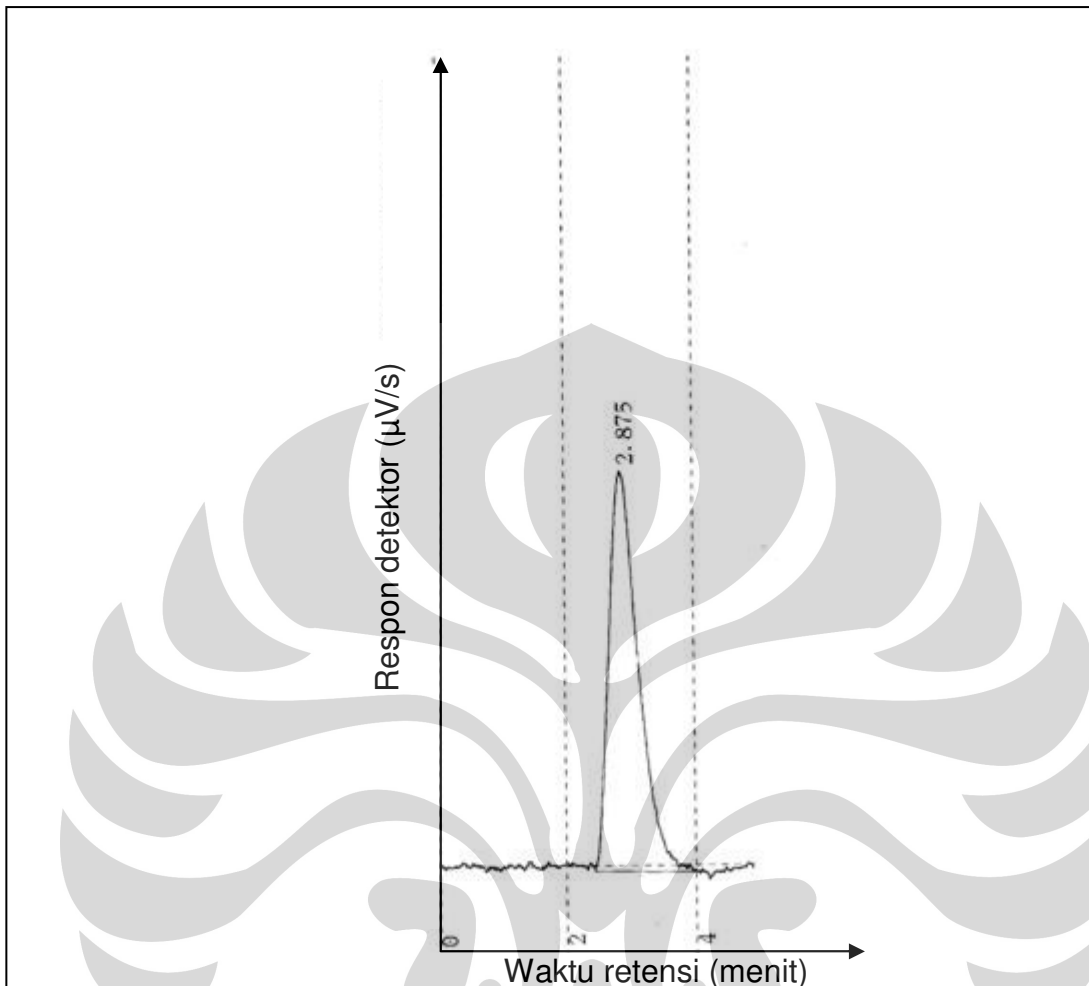
Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20  $\mu$ L

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

laju alir : 1,0 mL/menit

detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 520 \text{ nm}$



Gambar 17: Kromatogram thiokrom pada sampel 1 dalam pelarut isobutanol

Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20 µL

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

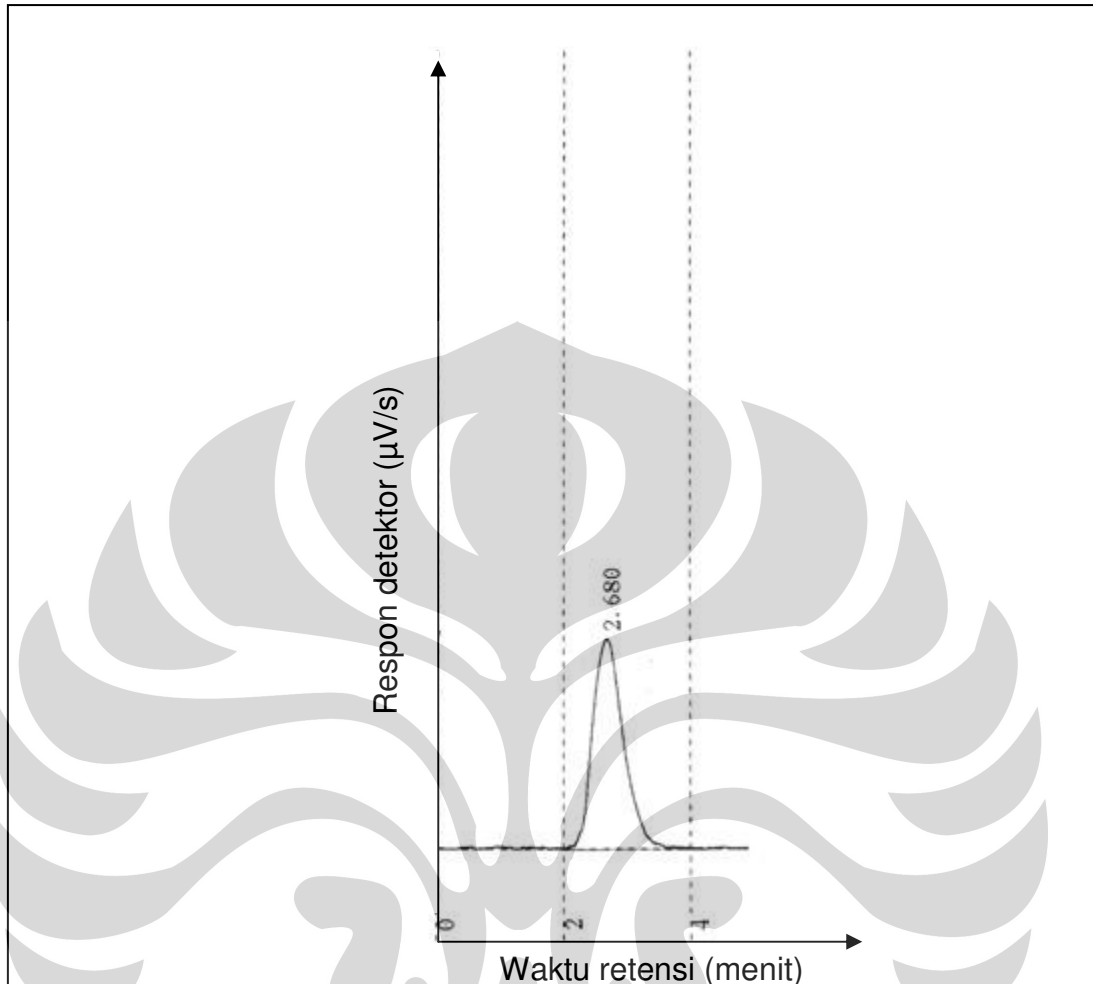
laju alir : 1,0 mL/menit

detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 435 \text{ nm}$

Keterangan:

Waktu retensi : 2,875 menit

Area : 172554 µV



Gambar 18: Kromatogram riboflavin pada sampel 1 dalam pelarut HCl 0,1N

Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20 µL

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

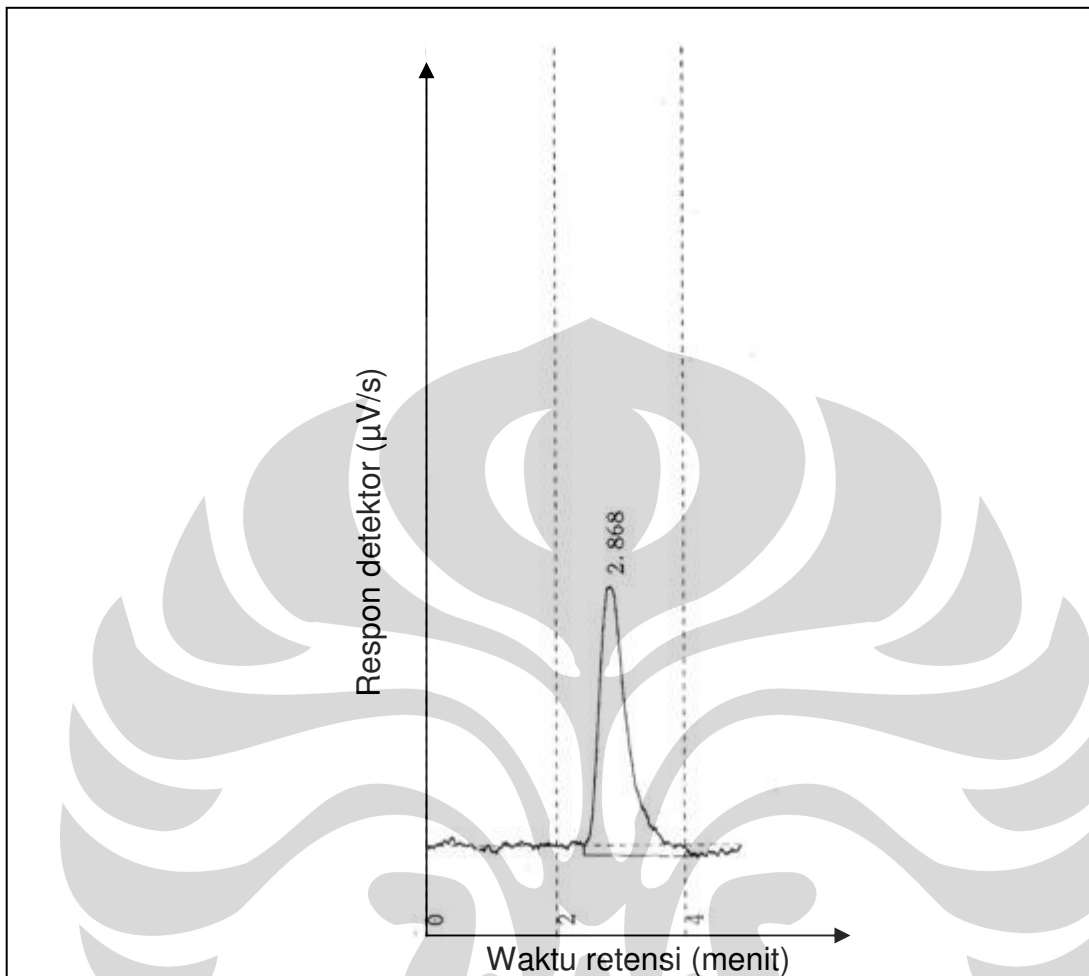
laju alir : 1,0 mL/menit

detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 520 \text{ nm}$

Keterangan:

Waktu retensi : 2,680 menit

Area : 98846 µV



Gambar 19: Kromatogram thiokrom pada sampel 2 dalam pelarut isobutanol

Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20  $\mu\text{L}$

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

laju alir : 1,0 mL/menit

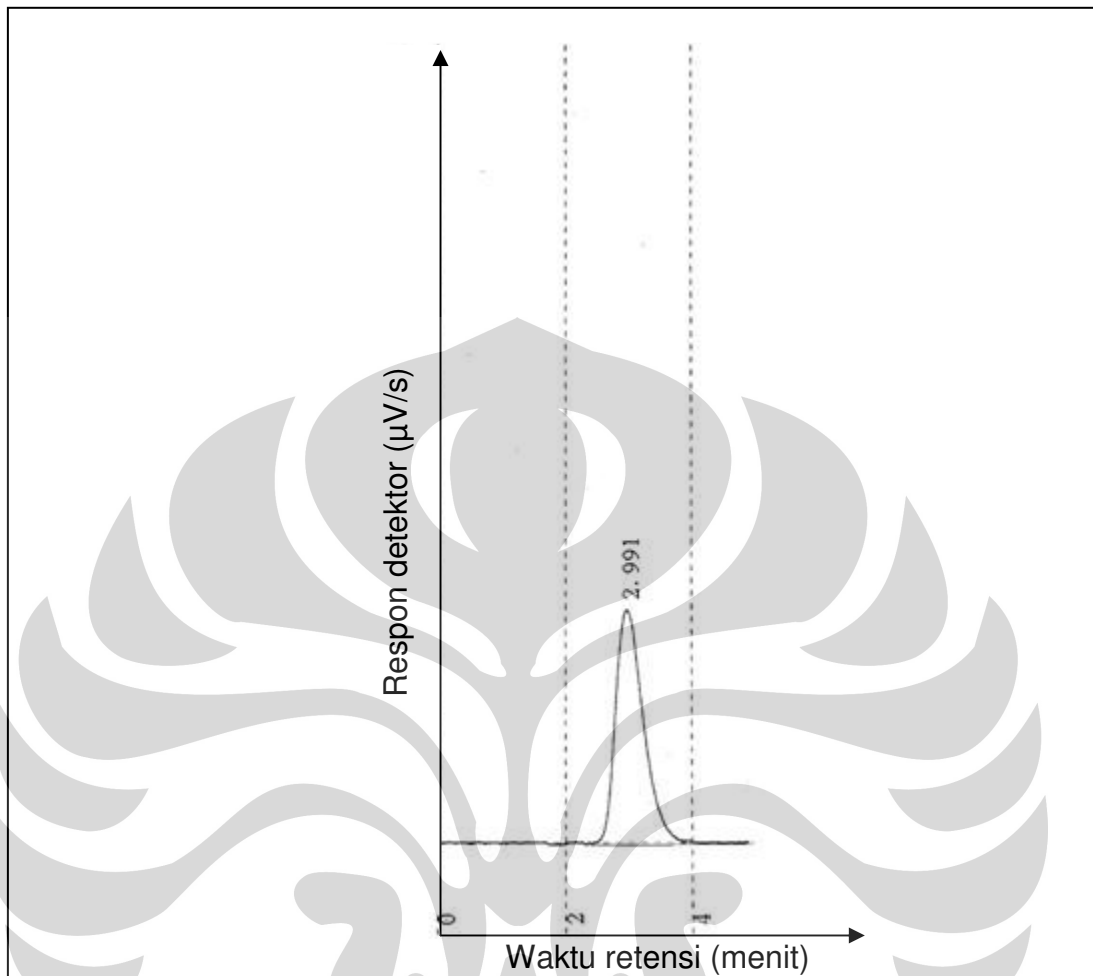
detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 435 \text{ nm}$

Keterangan:

Waktu retensi : 2,868 menit

Area : 117273  $\mu\text{V}$





Gambar 20: Kromatogram riboflavin pada sampel 2 dalam pelarut HCl 0,1N

Kondisi analisis:

volume penyuntikan : 20 µL

fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v

laju alir : 1,0 mL/menit

detektor fluoresensi :  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{emisi}} = 520 \text{ nm}$

Keterangan:

Waktu retensi : 2,991 menit

Area : 99771 µV





Tabel 2  
Kandungan berbagai vitamin pada susu (3)

Jenis Vitamin	Kadar
A (retinol) ( $\mu\text{g RE}$ )	400
D <sub>3</sub> (IU)	40
E ( $\mu\text{g}$ )	1000
K ( $\mu\text{g}$ )	50
B <sub>1</sub> ( $\mu\text{g}$ )	450
B <sub>2</sub> ( $\mu\text{g}$ )	1750
Niasin ( $\mu\text{g}$ )	900
B <sub>6</sub> ( $\mu\text{g}$ )	500
Asam pantotenat ( $\mu\text{g}$ )	3500
Biotin ( $\mu\text{g}$ )	35
Asam folat ( $\mu\text{g}$ )	55
B <sub>12</sub> ( $\mu\text{g}$ )	4,5
C (mg)	20

Tabel 3  
Komponen utama berbagai mineral pada susu (3)

Mineral Susu	Kandungan
Natrium (mg)	350-900
Kalium (mg)	1100-1700
Klorida (mg)	900-11000
Kalsium (mg)	1100-1300
Magnesium (mg)	90-140
Fosfor (mg)	900-1000
Besi ( $\mu\text{g}$ )	300-600
Zink ( $\mu\text{g}$ )	2000-6000
Tembaga ( $\mu\text{g}$ )	100-600
Mangan ( $\mu\text{g}$ )	20-50
Iodin ( $\mu\text{g}$ )	260
Fluorida ( $\mu\text{g}$ )	30-220
Selenium ( $\mu\text{g}$ )	24593
Kobalt ( $\mu\text{g}$ )	0,5-1,3
Krom ( $\mu\text{g}$ )	40038
Molibdenum ( $\mu\text{g}$ )	18-120
Nikel ( $\mu\text{g}$ )	0-50
Silikon ( $\mu\text{g}$ )	750-7000
Vanadium ( $\mu\text{g}$ )	sedikit-310
Timah ( $\mu\text{g}$ )	40-500
Arsen ( $\mu\text{g}$ )	20-60

Tabel 4  
Asupan thiamin hidroklorida yang dianjurkan setiap hari (16)

Kelompok	Jumlah yang dianjurkan (mg/hari)
Bayi dan anak-anak	
0-6 bulan	0,2
7-12 bulan	0,3
1-3 tahun	0,5
4-6 tahun	0,6
7-9 tahun	0,9
Remaja	
Wanita, 10-18 tahun	1,1
Pria, 10-18 tahun	1,2
Dewasa	
Wanita, $\geq 19$ tahun	1,1
Pria, $\geq 19$ tahun	1,2
Ibu hamil	1,4
Ibu menyusui	1,5

Tabel 5  
Asupan riboflavin yang dianjurkan setiap hari (16)

Kelompok	Jumlah yang dianjurkan (mg/hari)
Bayi dan anak-anak	
0-6 bulan	0,3
7-12 bulan	0,4
1-3 tahun	0,5
4-6 tahun	0,6
7-9 tahun	0,9
Remaja	
Wanita, 10-18 tahun	1,0
Pria, 10-18 tahun	1,3
Dewasa	
Wanita, $\geq$ 19 tahun	1,1
Pria, $\geq$ 19 tahun	1,3
Ibu hamil	1,4
Ibu menyusui	1,6

Tabel 6  
Data waktu retensi, ukuran efisiensi kolom, jumlah pelat teoritis, faktor ikutan, dan area thiokrom dan riboflavin pada berbagai kondisi berbeda

Komposisi fase gerak (kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril)	Zat	$t_R$ (menit)	HETP (cm/pelat)	N (pelat)	Tf	Area (cm <sup>2</sup> )
50:50 v/v	Thiokrom	2,700	0,925	27,04	1,38	3,70
	Riboflavin	2,795	0,482	51,84	1,75	1,54
40:60 v/v	Thiokrom	2,706	0,791	31,60	1,38	4,76
	Riboflavin	2,683	0,486	51,44	1,50	2,04
30:70 v/v	Thiokrom	2,753	0,749	33,38	1,67	3,58
	Riboflavin	2,689	0,541	46,24	1,60	1,50

Keterangan:

Kondisi optimum menggunakan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v dengan waktu retensi thiokrom dan riboflavin berturut-turut adalah 2,706 dan 2,683 menit, HETP thiokrom dan riboflavin berturut-turut adalah 0,791 dan 0,486 cm/pelat, jumlah pelat teoritis thiokrom dan riboflavin berturut-turut adalah 31,60 dan 51,44 pelat, faktor ikutan thiokrom dan riboflavin berturut-turut adalah 1,38 dan 1,50, area thiokrom dan riboflavin berturut-turut adalah 4,76 dan 2,04 cm<sup>2</sup>.



Tabel 7  
Data kurva kalibrasi dan linieritas thiokrom

Konsentrasi (ppm) (x)	Area ( $\mu\text{V/s}$ ) (y)	$\Delta y/\Delta x$
0,0516	73300	1051065,8915
0,0722	94994	1281686,0465
0,0826	108221	1118798,4496
0,1032	131313	1232500,0000
0,2064	258507	1300843,0233
0,3096	392754	

Persamaan garis :  $y = 1242132,1119x + 5597,4547$

Koefisien korelasi :  $r = 0,9995$

$S_{x_0}$  : 0,0025

$V_{x_0}$  : 1,8031

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370 \text{ nm}$  dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 435 \text{ nm}$

Tabel 8  
Data kurva kalibrasi dan linieritas riboflavin

Konsentrasi (ppm) (x)	Area ( $\mu\text{V/s}$ ) (y)	$\Delta y/\Delta x$
0,2048	35377	174399,4141
0,4096	71094	192324,2188
0,5120	90788	200224,6094
0,7168	131794	186606,4453
0,9216	170011	211748,0469
1,0240	191694	

Persamaan garis :  $y = 191627,1408x - 5879,8185$

Koefisien korelasi :  $r = 0,9994$

$S_{x_0}$  : 0,0086

$V_{x_0}$  : 1,3616

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445 \text{ nm}$  dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 520 \text{ nm}$

Tabel 9  
Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi thiokrom

Konsentrasi (ppm) (x)	Area ( $\mu\text{V/s}$ ) (y)	Area dari regresi ( $\mu\text{V/s}$ ) ( $y_i$ )	( $y-y_i$ ) <sup>2</sup>
0,0516	73300	69691,4717	13021476,6793
0,0722	94994	95329,0785	112277,5768
0,0826	108221	108147,8819	5346,2626
0,1032	131313	133785,4886	6113200,1149
0,2064	258507	261973,5226	12016778,9097
0,3096	392754	390161,5565	6720763,0713

$$S(y/x) = 3081,7950$$

$$\text{LOD} = 0,0074 \text{ ppm}$$

$$\text{LOQ} = 0,0248 \text{ ppm}$$

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370 \text{ nm}$  dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 435 \text{ nm}$

Tabel 10  
Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi riboflavin

Konsentrasi (ppm)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )	Area dari regresi ( $\mu\text{V/s}$ )	$(y-y_i)^2$
(x)	(y)	( $y_i$ )	
0,2048	35377	33365,4199	4046454,3545
0,4096	71094	72610,6584	2300252,6164
0,5120	90788	92233,2776	2088827,3110
0,7168	131794	131478,5160	99530,1382
0,9216	170011	170723,7545	508018,9221
1,0240	191694	190346,3737	1816096,7005

S (y/x) = 1647,6635  
 LOD = 0,0258 ppm  
 LOQ = 0,0860 ppm

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445 \text{ nm}$  dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 520 \text{ nm}$

Tabel 11  
Hasil uji presisi thiokrom

Konsentrasi (ppm)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata (ppm)	SD	KV
0,3096	392754	0,3117	0,3160	0,0062	1,95
	404566	0,3212			
	402402	0,3195			
	395307	0,3137			
	387010	0,3071			
	406714	0,3229			
0,1032	131313	0,1012	0,1003	0,0018	1,84
	127669	0,0983			
	127706	0,0983			
	129376	0,0997			
	132147	0,1019			
	133028	0,1026			
0,0516	73300	0,0545	0,0548	0,0009	1,66
	75337	0,0561			
	72627	0,0540			
	72747	0,0541			
	74692	0,0556			
	72997	0,0543			

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370 \text{ nm}$  dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 435 \text{ nm}$

Tabel 12  
Hasil uji presisi riboflavin

Konsentrasi (ppm)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata (ppm)	SD	KV
1,0240	191694	1,0310	1,0128	0,0169	1,67
	191350	1,0292			
	189513	1,0197			
	184564	0,9938			
	184286	0,9924			
	187764	1,0105			
0,5120	90788	0,5045	0,5103	0,0043	0,85
	92308	0,5124			
	92707	0,5145			
	91893	0,5102			
	91062	0,5059			
	92723	0,5146			
0,2048	35377	0,2153	0,2182	0,0038	1,74
	35178	0,2143			
	36827	0,2229			
	35734	0,2172			
	35632	0,2166			
	36853	0,2230			

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445 \text{ nm}$  dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 520 \text{ nm}$

Tabel 13  
 Hasil uji perolehan kembali thiamin hidroklorida yang dianalisis sebagai thiokrom

Konsentrasi yang ditambahkan (ppm)	Konsentrasi hasil pengenceran (ppm)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )	Konsentrasi dari kurva kalibrasi (ppm)	Persen (%)	Rata-rata (%)	KV
51,6	0,1651	210133	0,1647	99,74	99,16	0,68
		207423	0,1625	98,42		
		209276	0,1640	99,32		
61,92	0,1981	249933	0,1967	99,30	99,44	0,49
		249301	0,1962	99,04		
		251637	0,1981	99,99		
72,24	0,2312	291822	0,2304	99,67	99,20	0,42
		289509	0,2286	98,86		
		290107	0,2290	99,07		

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370 \text{ nm}$  dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 435 \text{ nm}$

Tabel 14  
Hasil uji perolehan kembali riboflavin

Konsentrasi yang ditambahkan (ppm)	Konsentrasi hasil pengenceran (ppm)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )	Konsentrasi dari kurva kalibrasi (ppm)	Persen (%)	Rata-rata (%)	KV
20,48	0,4096	72205	0,4075	99,48	99,33	0,18
		72123	0,4071	99,38		
		71937	0,4061	99,14		
25,6	0,512	91893	0,5102	99,65	99,63	0,35
		91519	0,5083	99,27		
		92192	0,5118	99,96		
30,72	0,6144	111329	0,6117	99,55	99,36	0,31
		111299	0,6115	99,53		
		110683	0,6083	99,00		

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445 \text{ nm}$  dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 520 \text{ nm}$



Tabel 15  
 Hasil penetapan kadar thiamin hidroklorida yang dianalisis sebagai thiokrom pada sampel 1

Berat yang ditimbang (g)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )	Konsentrasi dari kurva kalibrasi (ppm)	Konsentrasi yang diperoleh (ppm)	Rata-rata (ppm)	KV	Konsentrasi Etiket (ppm)	Persen (%)	Rata-rata (%)	KV
9,0447	173891	0,1355	4,6812	4,71	0,70	6,67	70,18	70,63	0,70
	174742	0,1362	4,7049						
	176236	0,1374	4,7464						
9,0236	171859	0,1339	4,6355	4,63	0,62	69,50	68,93	69,40	0,62
	170505	0,1328	4,5977						
	172529	0,1344	4,6542						
9,0362	172554	0,1344	4,6484	4,66	0,22	69,69	69,86	69,85	0,22
	172964	0,1347	4,6598						
	173302	0,1350	4,6692						

Kadar rata-rata =  $4,67 \pm 0,91$  ppm

Persen kadar rata-rata =  $69,96 \pm 0,91\%$

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370$  nm dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 435$  nm

Tabel 16  
Hasil penetapan kadar riboflavin pada sampel 1

Berat yang ditimbang (g)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )	Konsentrasi dari kurva kalibrasi (ppm)	Konsentrasi yang diperoleh (ppm)	Rata-rata (ppm)	KV	Konsentrasi Etiket (ppm)	Persen (%)	Rata-rata (%)	KV
9,0447	98846	0,5465	3,0212	3,01	0,29	2,78	108,67	108,32	0,29
	98374	0,5440	3,0075						
	98290	0,5436	3,0051						
9,0236	97849	0,5413	2,9994	3,00	0,08		107,89	107,79	0,08
	97729	0,5407	2,9959						
	97690	0,5405	2,9948						
9,0362	98106	0,5426	3,0026	3,00	0,09		108,01	107,90	0,09
	97939	0,5418	2,9978						
	97962	0,5419	2,9985						

Kadar rata-rata =  $3,00 \pm 0,27$  ppm

Persen kadar rata-rata =  $108,00 \pm 0,27\%$

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445$  nm dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 520$  nm

Tabel 17  
 Hasil penetapan kadar thiamin hidroklorida yang dianalisis sebagai thiokrom pada sampel 2

Berat yang ditimbang (g)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )	Konsentrasi dari kurva kalibrasi (ppm)	Konsentrasi yang diperoleh (ppm)	Rata-rata (ppm)	KV	Konsentrasi Etiket (ppm)	Persen (%)	Rata-rata (%)	KV
18,0821	118050	0,0905	0,6258	0,63	0,11	7,14	8,77	8,76	0,11
	117811	0,0903	0,6245						
	117970	0,0905	0,6254						
18,0769	117273	0,0899	0,6217	0,62	0,06		8,71	8,70	0,06
	117163	0,0898	0,6211						
	117156	0,0898	0,6210						
18,0555	116217	0,0891	0,6165	0,61	0,64		8,64	8,61	0,64
	116392	0,0892	0,6175						
	115083	0,0881	0,6102						

Kadar rata-rata =  $0,62 \pm 0,81$  ppm

Persen kadar rata-rata =  $8,69 \pm 0,81\%$

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 370$  nm dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 435$  nm

Tabel 18  
Hasil penetapan kadar riboflavin pada sampel 2

Berat yang ditimbang (g)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )	Konsentrasi dari kurva kalibrasi (ppm)	Konsentrasi yang diperoleh (ppm)	Rata-rata (ppm)	KV	Konsentrasi Etiket (ppm)	Persen (%)	Rata-rata (%)	KV
18,0821	99165	0,5482	3,7895	3,80	0,33	2,38	159,22	159,83	0,33
	99771	0,5513	3,8113				160,14		
	99756	0,5513	3,8108				160,12		
18,0769	98068	0,5424	3,7510	3,75	0,11		157,60	157,46	0,11
	98006	0,5421	3,7487				157,51		
	97848	0,5413	3,7430				157,27		
18,0555	97041	0,5371	3,7183	3,73	0,39		156,23	156,92	0,39
	97625	0,5401	3,7394				157,12		
	97816	0,5411	3,7463				157,41		

Kadar rata-rata =  $3,76 \pm 0,89$  ppm

Persen kadar rata-rata =  $158,07 \pm 0,89\%$

Keterangan:

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ , fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 4-asetonitril 40:60 v/v, laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor fluoresensi dengan  $\lambda_{\text{eksitasi}} = 445$  nm dan  $\lambda_{\text{emisi}} = 520$  nm





## Lampiran 1 Cara perhitungan linieritas

Kepekaan analisis:

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \approx \frac{y_3 - y_2}{x_3 - x_2} \approx \frac{y_4 - y_3}{x_4 - x_3} \approx \frac{y_n - y_{n-1}}{x_n - x_{n-1}}$$

Standar deviasi dari fungsi ( $S_{x_0}$ ):

$$S_{x_0} = \frac{\sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n-2}}}{b}$$

$b$  = slope

$n$  = jumlah data

$y_i = y$  dari kurva kalibrasi

Koefisien variasi dari fungsi ( $V_{x_0}$ ):

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{x}}$$

$\bar{x}$  = konsentrasi rata-rata

Lampiran 2  
Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

$$\text{Batas deteksi: } \frac{3 \times S_{y/x}}{b}$$

$$\text{Batas kuantitasi: } \frac{10 \times S_{y/x}}{b}$$

b = slope (b pada persamaan garis  $y = bx + a$ )

$S_{y/x}$  = simpangan baku

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y - y_i)^2}{n-2}}$$

n = jumlah data

y = luas puncak

$y_i$  = luas puncak berdasarkan persamaan regresi



Lampiran 3  
Cara perhitungan presisi

Simpangan baku:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{*n-1}}$$

X = konsentrasi

$\bar{x}$  = konsentrasi rata-rata

n = jumlah data

\* n - 1 untuk data > 3

n untuk data ≤ 3

Simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV):

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Lampiran 4  
Cara perhitungan uji perolehan kembali

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{\text{kadar hasil analisis}}{\text{kadar sesungguhnya}} \times 100\%$$

Kadar hasil analisis = konsentrasi dari kurva kalibrasi dikalikan faktor pengenceran



Lampiran 5  
Cara perhitungan penetapan kadar

$$\text{Kadar hasil analisis} = \frac{\text{konsentrasi dari kurva kalibrasi} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{berat sampel yang ditimbang}}$$

$$\% \text{ Kadar} = \frac{\text{kadar hasil analisis}}{\text{kadar yang tertera pada etiket}} \times 100\%$$

Kadar yang tertera pada etiket sampel 1:

Tiap takaran saji (45 g) mengandung:

Vitamin B<sub>1</sub> 0,3 mg atau 30% AKG

Vitamin B<sub>2</sub> 0,125 mg atau 10% AKG

Kadar yang tertera pada etiket sampel 2:

Tiap takaran saji (42 g) mengandung:

Vitamin B<sub>1</sub> 0,3 mg atau 30% AKG

Vitamin B<sub>2</sub> 0,1 mg atau 8% AKG

Lampiran 6  
Sertifikat analisis thiamin hidroklorida

**ZHONGJIN**

天津中津药业股份有限公司  
TIANJIN ZHONGJIN PHARMACEUTICAL CO., LTD  
No. 17 Bridge, Wai Huan Xian, Jie Fang South Road  
PC 300381 Tianjin, China

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Product: Thiamine Hydrochloride Serial Number: QC318-1-20080406

Quantity: 1000Kg Manufacturing Date: April -1-2008

Batch No: TH20080406 Expiring Date: March -31-2012

ITEMS	SPECIFICATIONS	RESULT
Description	White or almost white crystalline powder	White crystalline powder
Identification	Positive reaction	Positive reaction
pH	pH: 2.7-3.3	2.9
Clarity of Solution	Clear	Conforms
Color of Solution	Not more than solution Y7 or GY7	Conforms
Heavy Metals	≤ 10ppm	<10ppm
Sulphates	≤ 300ppm	Conforms
Water	≤ 5.0%	4.2%
Sulphated Ash	≤ 0.1%	0.05%
Absorbance of solution	≤ 0.025	0.017
Limit of nitrate	No brown ring	Conforms
Chromatographic Purity	≤ 1.0%	0.1%
Related substances	Any impurity ≤ 0.4% Total ≤ 1.0%	Conforms
Organic Volatile Impurities	Methanol ≤ 3000ppm Ethanol ≤ 5000ppm	Conforms
Assay	98.0%-102.0% (anhydrous substance)	99.72%

THE ABOVE PRODUCT CONFORMS TO THE STANDARD USP30/Ph.Eur.5.0/FCCIV

QC Manager 刘利军 Check 李国军 Quality Control 王芳

Lampiran 7  
Sertifikat analisis riboflavin

NOM 12

**RIBOFLAVIN UNIVERSAL***COVERSHEET FOR CERTIFICATE OF ANALYSIS*

Productcode : 0470406  
Lot No. : UQ71122251  
Analysis No. : 01644548


---

CFC Number : 01308562  
Articelocodo : 0470406231  
Sales Name : RIBOFLAVIN UNIVERSAL  
Manufacturing Date : 22.11.2007 ✓  
Best Use Before Date : 21.11.2010 ✓  
Delivery Number : 2822085886  
Destination : TG PRIOK PORT  
Customer Ref. No. : 257/2008-PH  
Customer Article No. :  
Customer Name : P.T. MENJANGAN SAKTI  
JL H.R. RASUNA SAID KAV B-34  
JAKARTA

---

Lampiran 7 (lanjutan)  
Sertifikat analisis riboflavin

RIBOFLAVIN UNIVERSAL

DSM 

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

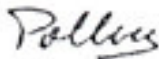
Productcode : 0470406  
Lot No. : 0071122251  
Analysis No. : 01844548

Test	Result	Limits / Specifications	Dimensional Units
Appearance	Powder	Powder	
Colour	Orange yellow	Yellow Orange yellow	
Identity	Corresponds	Corresponds	
Specific rotation (500nm, dried) (c=0.5 in NaOH (c=0.05 mol/l), 20°C) (c=0.5 in HCl (conc.), 25°C)	-132.4 53.6	-135.0 to -125.0 +56.5 to +58.5	degrees degrees
Absorbance			
Maximum 1	223	221 to 225	%
Maximum 2	267	265 to 269	%
Maximum 3	373	371 to 375	%
Maximum 4	445	442 to 448	%
Relative absorbance			
A373/A267	0.319	0.310 to 0.330	%
A445/A267	0.377	0.360 to 0.390	%
Loss on drying	0.6	max. 1.5	%
Sulphated ash	0.00	max. 0.10	%
Heavy Metals	<= 10 ppm	<= 10 ppm	
Lead	<= 2 ppm	<= 2 ppm	
Arsenic	<= 3 ppm	<= 3 ppm	
Mercury	<= 1 ppm	<= 1 ppm	
Cadmium	<= 1 ppm	<= 1 ppm	
Lumiflavin	<= 0.025 %	<= 0.025 %	
Primary aromatic amines	<= 100 ppm	<= 100 ppm	
Organic volatile impurities	Corresponds USP	Corresponds USP	
Assay (dried)	99.8	98.0 to 101.0	%
Fineness < 100 µm	99.1	min. 99.0	%

This lot was analysed and released by our authorized Quality Control Department and was found to meet the specifications as given above.

The product meets all requirements of the following valid compendia when tested accordingly:  
Ph.Eur. + USP + FCC

DSM Nutritional Products GmbH  
The Quality Assurance Manager



Rainer Polley