

METODE ANALISIS VITAMIN C DALAM URIN IN VITRO DAN
IN VIVO SECARA SPEKTROFOTOMETRI DAN
PENERAPANNYA PADA SEDIAAN VITAMIN C

VANIA GONES

0305050612



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

METODE ANALISIS VITAMIN C DALAM URIN IN VITRO DAN
IN VIVO SECARA SPEKTRIFOTOMETRI DAN
PENERAPANNYA PADA SEDIAAN VITAMIN C

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk
memperoleh gelar sarjana

VANIA GONES

0305050612




DEPOK


2009

SKRIPSI : METODE ANALISIS VITAMIN C DALAM URIN
IN VITRO DAN IN VIVO SECARA
SPEKTROFOTOMETRI DAN PENERAPANNYA
PADA SEDIAAN VITAMIN C

NAMA : VANIA GONES
NPM : 0305050612

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI
DEPOK, JUNI 2009


Drs. UMAR MANSUR, MSc.
PEMBIMBING I


Drs. HAYUN, MSi
PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana:	9 Juli 2009
Penguji I	: Dr. Katrin, MS
Penguji II	: Dra. Juheini Amin, MSi
Penguji III	: Dra. Maryati K., MSi



“Takut akan Tuhan adalah permulaan pengetahuan”

Amsal 1:7a

KATA PENGANTAR

K

K

K PenuliskbersyukurkepadaAllahKBapaKdanKTuhanKYesus,KkarenaK hanyaK atasK pimpinanK dank pertolongan-Nya,K makaK penulisk dapatK menyelesaikanKskripsiKini.KPenulisanKskripsiKiniKdilakukanKdalamKrangkaK memenuhiKsalahKsatuKsyaratKuntukKmencapaiKgelarKSarjanaKFarmasiK JurusanKFarmasiKpadaKFakultasKMatematikaKdanKIlmuKPengetahuanKAlamK UniversitasKIndonesia.KPenuliskmenyadariKbahwa,KtanpaKbantuanKdanK bimbinganKdariKberbagaiKpihak,KdariKmasaKperkuliahanKsampaiKpadaK penyusunanKskripsiKini,KsangatlahKsulitKbagikpenuliskuntukKmenyelesaikanK skripsiKini.KOlehKkarenaKtu,KpenuliskmengucapkanKterimaKkasihKkepada:K

(1)K Drs. KUmarKMansur, KMSc. KdanK Drs. KHayun, KMSi. KyangKtelahKbanyakK memberik masukanK dank bimbinganK selamaK penelitianK maupunK penyusunanKilakukanK

(2)K DraKRetnosariKAndrajatiKMS, KPhD., Kapt. KselakuKpembimbingKakademis,K yangKtelahKmemberikanKbimbinganKdankbantuanKselamaKmasaK pendidikanKdiKDepartemenKFarmasiK

(3)K Dr. KAhadianKHarahapKselakuKKetuaKDepartemenKFarmasiKFMIPA-UIK

(4)K SeluruhKstafKpengajar, Kaboran, KdanKkaryawan, KerutamaK PakKRustam, K PakKHadison, KPakKImi, KMbakKCatur, KMbakKYayu, KMbakKUIfa, KPakK Ma'ruf, KdanK PakKSurotoK

(5)K BuK AnitaKselakuKManagerKR&DKPTKKalbeKFarma, KTbk. KyangKtelahK memberikanKbantuanKberupaKstandarKasamKskorbatK

(6) KDra. KMaryati K., KMSi. Kselaku KKepala KLaboratorium KKimia KAnalisis K
Kualitatif KDepartemen KFarmasi KFMI PA UI K yang Ktelah Kmemberikan K
bantuan K kepada K penulis K untuk K memperoleh K bahan K kimia K untuk K
pereaksi. K

(7) KNenek, KMama, KIncing, KInde, Kdan KOmcing, Kdan KOmde K yang Kselalu K
memberikan Kdukungan K kepada K penulis, Kselama Kmasa Kperkuliahan K
sampai K dengan K penyusunan Kskripsi Kni. K

(8) KGitha, K selaku K relawan K dan K juga K sahabat, K yang K telah K bersedia K
membantu K dan K menolong K penulis K selama K penelitian K dilakukan. K

(9) KSu, KIfang, KTha, KDana, KDinda, KDisa, Ksebagai Ksahabat, K yang Kselalu K
memberi Kdukungan K dan K semangat, Kselama Kmasa Kperkuliahan K sampai K
dengan K penyusunan Kskripsi Kni. K

(10) KGalih, KNur, KOcta, KAchil, K dan K teman-teman K dari KBI K Kimia. K

(11) K Semua K pihak K yang K tidak K dapat K disebut K namanya K satu K persatu K
yang K juga K banyak K memberikan K bantuan K selama K penelitian K dan K
penyusunan Kskripsi Kni. K

K

Akhir K kata, K penulis K berharap K Tuhan K yang K Maha K Esa K berkenan K
segala K kebaikan K semua K pihak K yang K telah K membantu. K Semoga Kskripsi Kni K
membawa K manfaat K bagi K pengembangan K ilmu. K

K

Depok, K Juni K 2009 K

K

Penulis K

ABSTRAK

K
K

Vitamin C adalah vitamin karutair yang diperlukan dalam berbagai proses di dalam tubuh. Vitamin C tidak disintesis di dalam tubuh manusia, oleh karena itu, diperlukan tambahan dari luar tubuh. Vitamin C dosis tinggi telah banyak diindikasikan untuk menjaga sistem imun, menjaga kesehatan, dan suplemen kebutuhan vitamin. Efisiensi penggunaan vitamin C dosis tinggi belum diketahui dengan pasti. Peningkatan konsumsi menyebabkan peningkatan ekskresi melalui urin. Penelitian ini ditujukan untuk memvalidasi metode dan melihat terjadinya perubahan waktu paruh. Relawan dalam penelitian ini adalah seorang wanita berusia 21 tahun. Relawan menerima sediaan vitamin C 500 mg. Kemudian urin ditampung pada menit ke-100, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 330, 400, 460, 520, dan 600. Metode analisis yang digunakan adalah metode spektrofotometri UV-Vis dengan menggunakan 2,4-dinitrofenilhidrazin sebagai pereaksi. Metode ini mengukur total vitamin C, yaitu asam askorbat dan bentuk oksidasinya, asam dehidroaskorbat. Waktu paruh vitamin C yang diberikan pada dosis tinggi lebih pendek dibandingkan dengan waktu paruh vitamin C yang diberikan pada dosis rendah.

Kata Kunci: asam askorbat, asam dehidroaskorbat, vitamin C, spektrofotometri, 2,4-dinitrofenilhidrazin, validasi, waktu paruh

ix | 162 | l m ; g b r ; k a b ; k a m k

Daftar acuan: 22 (1964-2009) K

ABSTRACT

K

K

Vitamin C is a water-soluble vitamin that is essential for various body processes. Vitamin C is not synthesized in the human body. Therefore, human needs dietary intake of vitamin C. High dose preparations of vitamin C has been indicated to maintain immunity, health, and as a supplement for vitamin C needs. The efficiency of high dose of vitamin C has not been well accompanied. Increasing amount of consumption caused increasing amount excreted in urine. This study was intended to validate the method and to observe the alteration in vitamin C half-life. Volunteer used in this study is a 21-year-old woman. Volunteer consumed preparation containing 500 mg of vitamin C. Urine specimens were collected at 100, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 330, 400, 460, 520, and 600 minutes after administration. The analysis method was spectrophotometry UV-Vis using 2,4-dinitrophenylhydrazine. This method determines total vitamin C, ascorbic acid and its oxidized form, dehydroascorbic acid. Administration of high dose of vitamin C caused shorter half-life than administration of small dose of vitamin C.

K

Key Words: ascorbic acid, dehydroascorbic acid, vitamin C, spectrophotometry, 2,4-dinitrophenylhydrazine, validate, half-life

ix + 62 pg; pic; kab; enc

Bibliography: 22 (1964-2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. LATAR BELAKANG.....	1
B. TUJUAN PENELITIAN.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. SIFAT FISIKOKIMIA VITAMIN C.....	5
B. FUNGSI DAN EFEK KLINIS VITAMIN C.....	6
C. FARMAKOKINETIK VITAMIN C.....	7
D. ANALISIS ASAM ASKORBAT.....	8
E. VALIDASI METODE ANALISIS.....	11
BAB III BAHAN DAN CARA KERJA.....	15
A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN.....	15

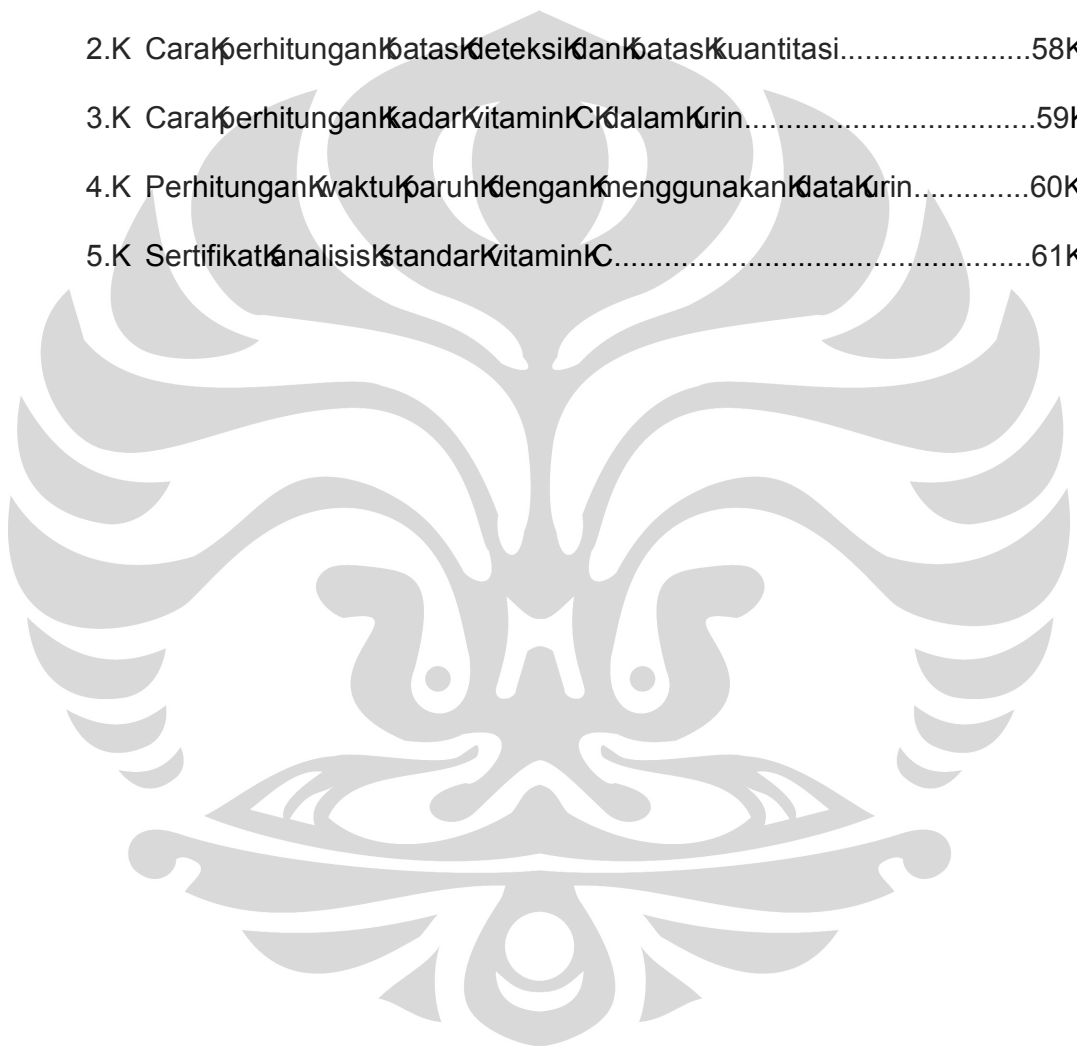
B.K ALATK.....	K15K
C.K BAHANK.....	K16K
D.K CARAKERJAK.....	K17K
BABKV. K HASILIDANPEMBAHASANK.....	K27K
BABKV. K KESIMPULANIDANISARANK.....	K37K
DAFTARACUANK.....	K39K

K
K
K
K
K
K
K
K
K
K
K
K
K
K
K



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	K	K	K	K	K	K	XXXXXXXXXXXX	Halaman
1.	K	Cara	Perhitungan	Simpangan	Baku	Koefisien	Variasi57K
2.	K	Cara	Perhitungan	Batas	Keteksiran	Batas	Kuantitasi58K
3.	K	Cara	Perhitungan	Kadar	Vitamin	C	dalam	Kirin.....59K
4.	K	Perhitungan	waktu	paruh	dengan	menggunakan	data	Kirin.....60K
5.	K	Sertifikat	Analisis	Standar	Vitamin	C	61K



BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Vitamin adalah senyawa organik yang diperlukan tubuh dalam jumlah kecil untuk melakukan berbagai proses metabolisme. Vitamin ada yang disintesis di dalam tubuh. Akan tetapi, jumlahnya hanya sedikit, sehingga diperlukan tambahan dari luar tubuh.

Kekurangan vitamin dapat terjadi pada diet atau pola makan yang kurang mencukupi, atau dapat terjadi pada saat terjadi peningkatan kebutuhan akan vitamin, misalnya pada masa kehamilan, atau adanya pengaruh obat atau penyakit. Secara klinis, vitamin digunakan dalam terapi defisiensi vitamin, atau untuk terapi penyakit lain yang berkaitan dengan vitamin tersebut (1).

Vitamin dosis tinggi telah digunakan untuk mengatasi berbagai gangguan yang berhubungan dengan vitamin yang bersangkutan. Akan tetapi, informasi mengenai keamanan penggunaan vitamin dosis tinggi masih kurang memadai. Penggunaan vitamin larut air dosis tinggi dapat menyebabkan ekskresi melalui urin meningkat sehubungan dengan kelarutannya dalam air. Sedangkan penggunaan vitamin larut lemak dosis

tinggi dapat menyebabkan vitamin tersebut terakumulasi di dalam tubuh dan berpotensi menimbulkan toksisitas (1).

Vitamin C dapat diperoleh dari bahan-bahan alami, maupun dari sediaan-sediaan yang mengandung vitamin C. Bahan-bahan alami yang mengandung vitamin C antara lain jeruk, lemon, brokoli, melon, pepaya, tomat, cabai, kentang, jambu biji, dan sayur-sayuran hijau (2). Di Indonesia, banyak sediaan yang mengandung vitamin C, baik yang berupa zat aktif tunggal, maupun campuran dengan senyawa lainnya. Contoh sediaan yang mengandung vitamin C dosis tinggi adalah Vitacimin[®], CDR[®], Ester C[®], You C 1000[®], dan Vitalong C[®]. Sediaan tersebut mengandung vitamin C dosis besar (>100 mg), dan dijual bebas di pasaran. Sediaan-sediaan vitamin C diindikasikan untuk menjaga sistem imun, menjaga kesehatan, maupun hanya sebagai suplemen kebutuhan vitamin C (3).

Pengukuran terhadap lamanya suatu senyawa berada di dalam tubuh dapat dilakukan dengan mengukur kadar obat tersebut di dalam darah, atau dengan mengukur kadar obat yang diekskresi melalui urin. Cara kedua dapat dilakukan apabila obat tersebut diekskresikan melalui urin dalam jumlah yang signifikan, atau mengalami ekskresi sebagian besar melalui urin (4). Vitamin C sebagai vitamin larut air, mengalami proses eliminasi melalui ginjal, sehingga cara tersebut dapat digunakan dalam penelitian yang dilakukan.

Parameter yang akan diukur adalah waktu paruh. Waktu paruh adalah waktu yang diperlukan oleh suatu senyawa untuk mencapai kadar separuh dari kadar semula (4). Waktu paruh dapat menggambarkan berapa lama

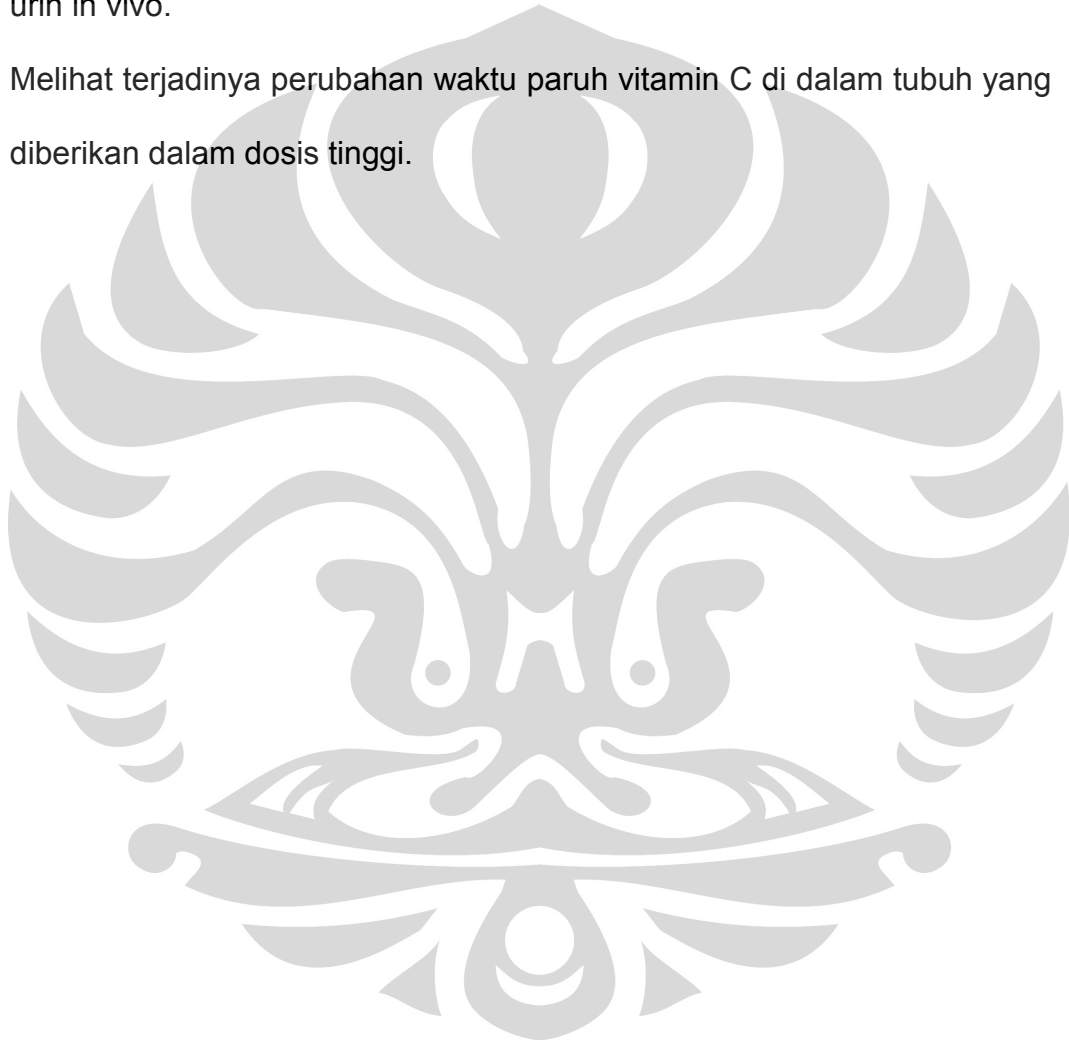
obat akan bertahan dalam tubuh. Semakin kecil waktu paruh, maka berarti semakin pendek waktu yang diperlukan agar obat mencapai kadar separuhnya. Semakin kecil waktu paruh, maka semakin singkat obat berada di dalam tubuh. Kemudian dari waktu paruh yang terukur dapat dilihat hubungannya dengan dosis regimen yang diberikan.

Efisiensi penggunaan vitamin C dosis tinggi belum diketahui dengan pasti (1). Vitamin C merupakan vitamin larut air, maka peningkatan konsumsinya akan dapat meningkatkan ekskresinya melalui urin. Penelitian untuk mengetahui hubungan antara dosis tinggi dan waktu paruh merupakan sebuah penelitian yang meliputi banyak tahapan.

Sebelum meneliti mengenai hubungan tersebut, perlu terlebih dahulu ditentukan metode yang sesuai untuk menganalisis secara kuantitatif vitamin C di dalam urin. Metode yang akan digunakan untuk menganalisis vitamin C yang terdapat dalam urin adalah spektrofotometri. Metode tersebut perlu divalidasi terlebih dahulu secara *in vitro* agar dapat dipastikan penggunaannya untuk analisis *in vivo*. Oleh karena itu, validasi metode analisis vitamin C dalam urin secara spektrofotometri perlu dilakukan sebagai penelitian pendahuluan.

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Melakukan validasi metode analisis vitamin C dalam urin in vitro secara spektrofotometri agar dapat digunakan untuk analisis vitamin C dalam urin in vivo.
2. Melihat terjadinya perubahan waktu paruh vitamin C di dalam tubuh yang diberikan dalam dosis tinggi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. SIFAT FISIKOKIMIA VITAMIN C

Vitamin C adalah senyawa dengan enam atom karbon. Vitamin C termasuk vitamin yang larut dalam air. Vitamin C merupakan penamaan umum untuk senyawa yang memiliki aktivitas biologis seperti asam askorbat (5).

Asam askorbat memiliki karakteristik antara lain serbuk hablur putih atau hampir putih (6,7), atau kristal tak berwarna, mudah larut dalam air, larut dalam alkohol, praktis tidak larut dalam eter (7), tidak larut dalam kloroform, dan benzen (6).

Asam askorbat mudah teroksidasi menjadi asam dehidroaskorbat (Gambar 1). Asam dehidroaskorbat memiliki aktivitas penuh dari vitamin C (5,8). Asam askorbat mudah rusak bila terpapar udara, terutama dalam medium yang bersifat alkali, dan bila terdapat tembaga yang bersifat sebagai katalisator (5,9).

B. FUNGSI DAN EFEK KLINIS VITAMIN C

Asam askorbat memiliki fungsi penting dalam pembentukan kolagen (2). Kolagen adalah jaringan yang menghubungkan jaringan satu dan jaringan lainnya. Kolagen terdiri atas serat protein tak larut air, yang menjaga kerapatan serta menyokong jaringan kulit, kartilago, tendon, ligament, pembuluh darah, tulang, dan gigi. Kolagen merupakan penyusun utama jaringan parut yang terbentuk selama penyembuhan luka dan fraktur tulang (2,10).

Vitamin C meningkatkan absorpsi besi pada saluran cerna dan meningkatkan penggunaannya di dalam tubuh. Vitamin C juga diperlukan dalam perubahan asam folat menjadi bentuk aktifnya. Kedua senyawa tersebut, besi dan asam folat, merupakan senyawa penting yang diperlukan dalam pembentukan hemoglobin, sehingga secara tidak langsung, vitamin C memiliki fungsi penting dalam pembentukan hemoglobin (2).

Vitamin C juga berperan dalam metabolisme lemak dan protein. Tingginya konsentrasi asam askorbat dalam kelenjar adrenal, serta kehilangannya selama kelenjar adrenal terstimulasi menunjukkan perlunya vitamin C selama masa stress. Kadar vitamin C darah yang menurun ketika demam juga menunjukkan perlunya vitamin C selama kondisi demam (2).

Dosis harian vitamin C yang direkomendasikan untuk dewasa adalah 30-100 mg (1). Akan tetapi, terdapat kebutuhan vitamin C setiap individu

bervariasi (1). Manusia tidak mampu mensintesis vitamin C, sehingga memerlukan asupan vitamin C dari luar (1).

C. FARMAKOKINETIKA VITAMIN C

Asam askorbat cepat diabsorpsi dari saluran cerna (1, 5, 9). Absorpsi asam askorbat dosis tunggal hingga 180 mg adalah 71%, pada 1,5 g adalah 50%, dan pada dosis melebihi 12 g adalah 16% (10).

Asam askorbat terdapat di dalam plasma, dan terdistribusi ke seluruh sel tubuh. Konsentrasi asam askorbat dalam leukosit dan platelet lebih tinggi dibandingkan dalam eritrosit dan plasma (5,9). Konsentrasi vitamin C dalam leukosit terkadang digunakan untuk menggambarkan kadarnya dalam jaringan tubuh karena kurang terpengaruh terhadap penurunan jika dibandingkan dengan konsentrasi dalam plasma (5).

Asam askorbat dimetabolisme menjadi asam dehidroaskorbat (1,5,11,12), asam 2,3-diketogulonat (1,5,11,12), oksalat (5,11,12) dan CO₂ (5,12). Terdapat pula konjugasi dengan sulfat membentuk askorbat-3-sulfat; (5,9). Asam askorbat dalam jumlah yang besar dengan cepat dieliminasi melalui urin.

Pada pemberian vitamin C dosis tunggal, baik oral maupun intravena bolus, sampai dengan 60 mg/hari, jumlah asam askorbat yang diekskresikan melalui urin hingga jam ke-24 < 0,4 mg. Pada dosis 100 mg/hari, baik secara

oral maupun intravena bolus, jumlah asam askorbat yang diekskresikan melalui urin hingga jam ke-24 sekitar 25 mg. Pada dosis 500-1250 mg, seluruh dosis diekskresikan melalui urin. Waktu paruh dari vitamin C yang diberikan 60 mg/hari sekitar 12 hari, sedangkan waktu paruh dari vitamin C yang diberikan lebih dari 500 mg < 2 jam (4).

D. ANALISIS ASAM ASKORBAT

1. Pengukuran konsentrasi obat (4)

Pengukuran konsentrasi obat adalah hal yang penting dalam menentukan farmakokinetik individual atau populasi. Konsentrasi obat diukur dalam sampel biologis, seperti susu, saliva, plasma, dan urin. Metode yang sensitif, akurat, dan presisi diperlukan dalam pengukuran langsung konsentrasi obat dalam matriks biologi.

2. Pengambilan spesimen (4)

Metode pengambilan spesimen terdiri dari dua macam, yaitu metode invasif, dan metode non-invasif. Metode invasif terdiri dari pengambilan sampel darah, cairan spinal, cairan sinovial, biopsi jaringan, atau sampel biologis lainnya yang memerlukan intervensi parenteral atau pembedahan pasien. Metode non-invasif terdiri dari pengambilan sampel urin, saliva, atau

sampel biologis lainnya yang dapat diperoleh tanpa melakukan intervensi parenteral atau pembedahan.

Pengukuran konsentrasi obat maupun metabolitnya dalam sampel biologis tersebut memberikan informasi yang penting. Sebagai contoh yaitu jumlah obat yang disimpan, atau ditransportasikan ke dalam jaringan atau cairan tubuh, dosis, dosis yang memberikan efek farmakologis atau efek toksik, dan pembentukan serta transportasi metabolit.

3. Konsentrasi obat dalam urin (4)

Pengukuran konsentrasi obat dalam urin adalah metode yang digunakan untuk memastikan bioavailabilitas obat secara tidak langsung. Kecepatan ekskresi dan jumlah obat yang diekskresi melalui urin menggambarkan kecepatan absorpsi dan jumlah obat yang terabsorpsi secara sistemik. Penggunaan pengukuran konsentrasi obat dalam urin adalah untuk menentukan parameter farmakokinetik yang bersangkutan.

4. Metode analisis asam askorbat

Asam askorbat dapat dianalisis dengan metode titrasi iodimetri (1,7), titrasi oksidimetri, spektrofotometri (15), spektrokolorimetri (10,15,16,17), kromatografi gas (15), dan kromatografi cair kinerja tinggi (8,13,15,18).

Metode analisis yang digunakan dalam penelitian adalah spektrokolorimetri dengan menggunakan 2,4-dinitrofenilhidrazin (16). Asam askorbat dioksidasi terlebih dahulu menjadi asam dehidroaskorbat. Asam dehidroaskorbat kemudian bereaksi dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam suasana asam, membentuk senyawa 2,4-dinitrofenilhidrazon (10,16,17), dan 2,4-dinitrofenilosazon (15,17,18). Senyawa tersebut akan memberi warna jingga-merah dengan penambahan asam sulfat, yang kemudian dapat diukur pada panjang gelombang 520 nm (16).

Metode yang dilakukan dapat digunakan untuk mengukur asam askorbat, asam dehidroaskorbat, dan asam diketogulonat. Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 2.

5. Perhitungan K dari data ekskresi urin (14)

Tetapan laju eliminasi, K, dapat dihitung dari data ekskresi urin. Laju ekskresi obat dianggap sebagai order kesatu. Laju ekskresi obat melalui urin (dD_u/dt) tidak dapat ditentukan melalui percobaan segera setelah pemberian obat. Dalam praktek, urin dikumpulkan pada jarak waktu tertentu dan konsentrasi obat dianalisis. Kemudian laju ekskresi urin rata-rata dihitung untuk tiap waktu pengumpulan. Harga dD_u/dt rata-rata digambar pada suatu skala semilogaritmik terhadap waktu yang merupakan harga tengah (titik tengah/ t_{mid}) waktu pengumpulan.

E. VALIDASI METODE ANALISIS (20, 21)

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Parameter-parameter yang diukur antara lain kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), kurva kalibrasi, dan stabilitas analit di dalam matriks.

1. Kecermatan (Akurasi)

Kecermatan adalah kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai hasil perolehan kembali dari analit yang ditambahkan. Syarat untuk sampel berupa cairan biologis adalah $100 \pm 15\%$, dan $100 \pm 20\%$ untuk lower limit of quantification (LLOQ).

2. Keseksamaan (Presisi)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran matriks biologis yang homogen. Kriteria seksama diberikan jika

metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi tidak lebih dari 15%.

3. Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi adalah hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi tertentu analit. Kurva kalibrasi harus mewakili analit dalam sampel. Kurva kalibrasi harus dibuat dari matriks biologis yang sama dengan menambahkan matriks dengan sejumlah tertentu analit, yang diketahui konsentrasinya. Kurva kalibrasi harus dibuat dari enam hingga delapan konsentrasi larutan yang berbeda, yang mencakup konsentrasi analit dalam sampel.

Hubungan yang baik dan proporsional antara respon instrumen dan konsentrasi analit dilihat dengan parameter linearitas. Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Sebagai parameter adanya hubungan linier, digunakan hubungan korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier diperoleh bila $r = +1$ atau -1 .

4. 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 blanko. 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.

5. Stabilitas

Stabilitas obat dalam cairan biologis adalah fungsi dari kondisi penyimpanan, sifat kimia obat, matriks, dan wadah yang digunakan. Prosedur uji stabilitas dilakukan untuk menilai stabilitas analit selama pengumpulan dan penanganan sampel. Kondisi dalam prosedur uji stabilitas harus mewakili kondisi pada saat penanganan sampel. Uji stabilitas dilakukan dengan menggunakan sampel yang dibuat baru. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % diff dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram (22).



BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Analisis Kuantitatif Departemen Farmasi FMIPA UI Depok selama kurang lebih tiga bulan dari bulan Maret hingga Mei 2009.

B. ALAT

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Acculab ALC#210.4), penangas air (Memmert WNB7#45), vortex, lemari pendingin (LG express cool), freezer (LG express cool), dan spektrofotometer UV-Vis (Jasco V#530).

C. BAHAN

—
—

1. Spesimen urin

—
—

Urin diperoleh dari relawan wanita berusia 21 tahun yang mengkonsumsi seminimal mungkin bahan yang mengandung vitamin C, dan tidak mengkonsumsi obat#obatan selama analisis dilakukan.

—
—
—

2. Bahan uji

—
—

Bahan uji yang digunakan adalah sediaan tablet hisap 'V' yang mengandung 500 mg vitamin C.

—
—
—

3. Bahan kimia

—
—

Bahan#bahan kimia yang digunakan adalah standar vitamin C (Shijiazhuang Pharma), aqua demineralisata, asam sulfat (Merck), asam trikloroasetat (Merck), kupri sulfat pentahidrat (Merck), 2,4#dinitrofenilhidrazin (Sigma), tiourea (Merck).

—
—
—

—

D. CARA KERJA

1. Prosedur pembuatan larutan pereaksi

a. Pembuatan asam sulfat 4,5 M

Aqua demineralisata sebanyak 250 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 500 mL. Kemudian ditambahkan perlahan 125 mL asam sulfat pekat. Volume dicukupkan hingga batas dengan aqua demineralisata. Larutan disimpan dalam lemari pendingin. Selama pembuatan larutan, wadah ditempatkan dalam wadah lain yang berisi es.

b. Pembuatan asam sulfat 12 M

Aqua demineralisata sebanyak 30 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian ditambahkan perlahan 65 mL asam sulfat pekat. Volume dicukupkan hingga batas dengan aqua demineralisata. Larutan disimpan dalam lemari pendingin. Selama pembuatan larutan, wadah ditempatkan dalam wadah lain yang berisi es.

c. Pembuatan pereaksi 2,4-Dinitrofenilhidrazin

2,4-Dinitrofenilhidrazin ditimbang seksama sebanyak 2,0 g. Asam sulfat 4,5 M sebanyak 30 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Ke dalam labu ukur tersebut ditambahkan perlahan 2,4-Dinitrofenilhidrazin 2,0 g. Larutan dicampur selama 10 menit, dan volume dicukupkan hingga batas dengan asam sulfat 4,5 M. Akan diperoleh larutan pereaksi 2,4-Dinitrofenilhidrazin 2g/dL asam sulfat 4,5 M. Simpan dalam lemari pendingin semalaman, dan saring sebelum digunakan.

d. Pembuatan larutan pereaksi tiourea

Tiourea ditimbang seksama sebanyak 5,0 g. Kemudian dilarutkan dalam labu ukur 100 mL dengan aqua demineralisata hingga batas. Akan diperoleh larutan pereaksi tiourea 5 g/dL.

e. Pembuatan larutan pereaksi kupri sulfat pentahidrat

Kupri sulfat pentahidrat ditimbang seksama sebanyak 6,0 g. kemudian dilarutkan dalam labu ukur 100 mL dengan aqua demineralisata hingga batas. Akan diperoleh larutan pereaksi kupri sulfat pentahidrat 0,6 g/dL.

f. Pembuatan larutan pereaksi 2,4-Dinitrofenilhidrazin#tiourea#copper sulfat (DTC)

Larutan pereaksi 2,4-Dinitrofenilhidrazin sebanyak 50 mL dimasukkan ke dalam tabung ukur 100 mL. Kemudian ditambahkan 2,5 mL larutan pereaksi tiourea dan 2,5 mL larutan pereaksi kupri sulfat pentahidrat. Campuran dihomogenkan dan disimpan dalam wadah gelas. Larutan pereaksi stabil selama 2 minggu bila disimpan pada suhu 4°C.

g. Pembuatan larutan asam trikloroasetat

Asam trikloroasetat ditimbang seksama sebanyak 50,0 g. Kemudian dilarutkan dalam labu ukur 500 mL dengan aqua demineralisata hingga batas. Akan diperoleh larutan asam trikloroasetat 10 g/dL.

2. Prosedur penanganan spesimen urin

Larutan asam trikloroasetat 10 g/dL sebanyak 4,0 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1,0 mL urin dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10-20 detik. Dari larutan yang diperoleh, dipipet 2,4 mL, dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain. Kemudian ditambahkan 0,8 mL larutan pereaksi DTC, dan tabung ditutup dengan menggunakan parafilm. Larutan dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10-20 detik. Tabung tersebut kemudian

diinkubasi di dalam penangas air selama 3 jam pada suhu $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Setelah inkubasi, tabung dipindahkan ke dalam wadah yang berisi es dan didiamkan selama 10 menit. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan perlahan 4,0 mL larutan asam sulfat 12 M dingin. Setelah penambahan, suhu tabung diusahakan agar tidak melebihi suhu ruang. Tabung didiamkan selama 20 menit pada suhu ruang, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur blanko pada panjang gelombang maksimum 520 nm.

3. Prosedur pembuatan larutan blanko

Larutan asam trikloroasetat 10 g/dL sebanyak 4,0 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1,0 mL urin relawan, yang tidak menerima vitamin C, dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10-20 detik. Dari larutan yang diperoleh, dipipet 2,4 mL, dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain. Kemudian ditambahkan 0,8 mL larutan pereaksi DTC, dan tabung ditutup dengan menggunakan parafilm. Larutan dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10-20 detik. Tabung tersebut kemudian diinkubasi di dalam penangas air selama 3 jam pada suhu $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Setelah inkubasi, tabung dipindahkan ke dalam wadah yang berisi es dan di diamkan selama 10 menit. Lalu ke dalam tabung tersebut ditambahkan perlahan 4,0 mL larutan asam sulfat 12 M dingin. Setelah penambahan suhu tabung tidak boleh melebihi suhu ruang. Tabung

—
 didiamkan selama 20 menit pada suhu ruang, kemudian larutan digunakan sebagai larutan blanko dalam analisis.

—
 —
 4. Prosedur pembuatan larutan asam askorbat standar untuk pembuatan kurva kalibrasi

—
 —
 a. Pembuatan larutan induk

—
 —
 Standar asam askorbat ditimbang seksama sebanyak 50,0 mg. Kemudian dilarutkan dalam campuran urin dan larutan asam trikloroasetat 10 g/dL (1:4) hingga 100 mL dalam labu ukur. Akan diperoleh larutan asam askorbat 50,0 mg/dL (500 Bg/mL). Larutan induk selalu dibuat segar dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

—
 —
 b. Pembuatan larutan intermediet

—
 —
 Larutan induk dipipet 10,0 mL dengan menggunakan pipet volum. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang telah berisi 50 mL larutan campuran urin dan larutan asam trikloroasetat (1:4). Volume dicukupkan hingga batas dengan larutan campuran urin dan larutan asam trikloroasetat (1:4). Akan diperoleh larutan intermediet asam askorbat 50 Bg/mL.

c. Pembuatan larutan kerja

Dari larutan intermediet, dipipet 2,0; 4,0; 6,0; 15,0; dan 20,0 mL, dengan menggunakan pipet volum. Volume dicukupkan dengan larutan campuran urin dan larutan asam trikloroasetat (1:4) hingga 25 mL dalam tabung ukur. Akan diperoleh larutan kerja dengan konsentrasi 4, 8, 12, 30, dan 40 Bg/mL.

5. Prosedur pembuatan spektrum serapan

Larutan kerja 12 ppm dipipet sebanyak 2,4 mL ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 0,8 mL larutan pereaksi DTC, dan tabung ditutup dengan menggunakan parafilm. Larutan dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10-20 detik. Tabung tersebut kemudian diinkubasi di dalam penangas air selama 3 jam pada suhu $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Setelah inkubasi, tabung dipindahkan ke dalam wadah yang berisi es dan didiamkan selama 10 menit. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan perlahan 4,0 mL larutan asam sulfat 12 M dingin. Setelah penambahan, suhu tabung tidak boleh melebihi suhu ruang. Tabung didiamkan selama 20 menit pada suhu ruang, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur blanko, dan dilihat panjang gelombang maksimumnya.

6. Prosedur penentuan lama pendiaman hasil inkubasi yang telah ditambahkan asam sulfat 12 M

Larutan kerja 12 ppm dipipet sebanyak 2,4 mL ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 0,8 mL larutan pereaksi DTC, dan tabung ditutup dengan menggunakan parafilm. Larutan dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10-20 detik. Tabung tersebut kemudian diinkubasi di dalam penangas air selama 3 jam pada suhu $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Setelah inkubasi, tabung dipindahkan ke dalam wadah yang berisi es dan didiamkan selama 10 menit. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan perlahan 4,0 mL larutan asam sulfat 12 M dingin. Setelah penambahan, suhu tabung tidak boleh melebihi suhu ruang. Tabung didiamkan selama 20-32 menit pada suhu ruang, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur blanko, dan dilihat perbedaan serapan yang diberikan tiap menit.

7. Prosedur pembuatan kurva kalibrasi

Dari masing-masing larutan kerja, dipipet 2,4 mL, dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 0,8 mL larutan pereaksi DTC, dan tabung ditutup dengan menggunakan parafilm. Larutan dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10-20 detik. Tabung tersebut kemudian diinkubasi di dalam penangas air selama 3 jam pada suhu $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Setelah inkubasi, tabung dipindahkan ke dalam wadah yang berisi es dan didiamkan

selama 10 menit. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan perlahan 4,0 ml larutan asam sulfat 12 M dingin. Setelah penambahan, suhu tabung tidak boleh melebihi suhu ruang. Tabung didiamkan selama 20 menit pada suhu ruang, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur blanko pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari pembuatan spektrum serapan.

8. Prosedur analisis vitamin C dalam urin in vivo

Sediaan tablet hisap yang mengandung vitamin C 500 mg dikonsumsi oleh relawan. Relawan berpuasa selama minimal 4 jam. Urin blanko diambil ketika relawan menerima sediaan vitamin C ($t = 0$ jam). Tablet digigit hancur dan ditelan segera. Kemudian urin diambil pada waktu 100, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 330, 400, 460, 520, dan 600 menit. Setiap urin yang tertampung dicatat volumenya, dan segera dianalisis sesuai dengan prosedur penanganan spesimen urin.

9. Prosedur uji stabilitas asam askorbat dalam campuran urin dan asam trikloroasetat (1:4)

Standar asam askorbat ditimbang seksama sebanyak 50,0 mg. Kemudian dilarutkan dalam labu ukur 100 mL dengan menggunakan urin relawan yang tidak menerima vitamin C. Larutan dipipet 20,0 dan 10,0 mL

dengan menggunakan pipet volum, ke dalam labu ukur 50 mL, dan volume dicukupkan hingga batas. Akan diperoleh larutan dengan konsentrasi 200 dan 100 Bg/mL. Dari larutan 100 Bg/mL, dipipet 8,0 mL dengan menggunakan pipet volum, dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Akan diperoleh larutan dengan konsentrasi 16 Bg/mL.

Larutan asam trikloroasetat 10 g/dL sebanyak 4,0 mL dimasukkan ke dalam sembilan tabung reaksi. Kemudian ditambahkan masing-masing tiga tabung untuk tiap konsentrasi, 1,0 mL larutan 16, 100, dan 200 Bg/mL. Larutan dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10-20 detik, kemudian disimpan pada suhu ruang, lemari pendingin, dan freezer selama 10 jam. Setelah 10 jam, larutan kemudian dianalisis.

10. Pengolahan data

Data diolah untuk menentukan kurva kalibrasi, linieritas, koefisien variasi, perolehan kembali, dan perubahan waktu paruh dengan menggunakan rumus perubahan jumlah obat dalam urin per satuan waktu (dD_u/dt).



BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PERCOBAAN

1. Penentuan panjang gelombang maksimum

Pada awal penelitian, dicari panjang gelombang maksimum untuk analisis vitamin C dalam campuran urin dan asam trikloroasetat (1:4). Berdasarkan kurva serapan yang dibuat, panjang gelombang maksimum yang didapat 521 nm. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 3.

2. Validasi Metode Analisis

a. Waktu pendiaman hasil inkubasi setelah penambahan asam sulfat 12 M

Dari hasil uji stabilitas terhadap hasil inkubasi yang telah ditambahkan asam sulfat 12 M, diketahui bahwa senyawa dapat didiamkan pada suhu ruang antara 20-30 menit. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Y

b. Pembuatan kurva kalibrasi dan pengujian linearitas

Y
Y

Persamaan garis linear untuk vitamin C adalah $y = 0,019x + 0,076$

dengan koefisien korelasi, r , adalah 0,9992. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4 dan Tabel 2.

Y
Y
Y

c. Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi

Y
Y

Batas deteksi dan batas kuantitasi vitamin C berturut-turut yaitu 2,2105 g/mL dan 7,3685 g/mL. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Y
Y

d. Uji presisi

Y
Y

Larutan vitamin C dalam campuran urin dan asam trikloroasetat (1:4) dengan konsentrasi 3,5975 g/mL; 12,2165 g/mL; dan 40,765 g/mL masing-masing memberikan nilai koefisien variasi berturut-turut 2,01%; 3,21%; dan 1,88%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.

Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y

e. Uji stabilitas vitamin C

Dari uji stabilitas vitamin C dalam campuran urin dan asam trikloroasetat (1:4) selama 10 jam dalam suhu ruang, kamar pendingin, dan kulkas, diketahui bahwa semakin rendah suhu, maka stabilitas semakin baik. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 5, 6, dan Tabel 5,.

3. Analisis vitamin C dalam tubuh

a. Penetapan kadar vitamin C dalam urin *In vivo*

Dari percobaan yang dilakukan, diperoleh kadar vitamin C dalam urin yang bervariasi, yaitu 12,0145 g/mL – 144,8947 g/mL. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6.

b. Perubahan waktu paruh vitamin C dalam tubuh

.Dari hasil percobaan yang dilakukan terhadap relawan, terlihat terjadinya perpanjangan waktu paruh sebesar lima kali. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 7, 8 dan Tabel 7.

B. PEMBAHASAN

v
v

Analisis vitamin C merupakan analisis yang sulit karena vitamin C merupakan antioksidan yang sangat kuat. Vitamin C, atau disebut juga asam askorbat, mudah terurai oleh pengaruh cahaya, panas, dan faktor lainnya. Oleh karena itu penanganan larutan harus secepat mungkin dan dengan penyimpanan pada suhu dingin.

Dalam penelitian ini, penulis menggunakan metode spektrofotometri dengan menggunakan 2,4-dinitrofenilhidrazin. Kesulitan menggunakan metode tersebut adalah panjangnya waktu analisis, pengaruh suhu dan waktu, serta keterbatasan stabilitas larutan pereaksi DTC yang digunakan. Dengan demikian, selama analisis kondisi pelaksanaan analisis harus dipertahankan untuk tetap stabil sehingga diperoleh hasil yang optimal.

v
v

1. Validasi metode analisis

v
v
v

Validasi yang pertama kali dilakukan adalah penentuan lama pendiaman hasil inkubasi setelah ditambahkan asam sulfat 12 M pada suhu ruang. Uji tersebut bertujuan untuk melihat perbedaan besar serapan bila hasil inkubasi yang telah ditambahkan asam sulfat 12 M dingin, didiamkan pada suhu ruang. Hasil uji menunjukkan bahwa sampai menit ke-30, pengukuran masih dapat dilakukan karena koefisien variasi yang diberikan

sebesar 0,777%. Hasil tersebut dijadikan acuan dalam pelaksanaan analisis selanjutnya.

Validasi yang kedua adalah pembuatan kurva kalibrasi. Tujuan pembuatan kurva kalibrasi adalah untuk melihat linieritas hubungan antara konsentrasi vitamin C dengan serapan yang diberikan. Dari kelima konsentrasi yang digunakan, diperoleh koefisien korelasi, $r = 0,9992$. Untuk analisis sediaan biologis, kurva kalibrasi yang diperoleh sudah cukup linier.

Faktor yang dapat mempengaruhi linieritas misalnya homogenitas larutan, kondisi saat melarutkan, pemipetan, serta reaksi kimia yang terjadi. Karena faktor-faktor tersebut, maka sulit diperoleh nilai koefisien korelasi, r , sebesar 0,9999. Dari kurva kalibrasi tersebut juga diperoleh nilai batas deteksi dan batas kuantitasi masing-masing sebesar 2,2105 µg/mL dan 7,3685 µg/mL.

Setelah pembuatan kurva kalibrasi, dilakukan uji presisi. Uji presisi bertujuan untuk melihat keterulangan hasil analisis. Dari tiga konsentrasi yang dilakukan, diperoleh hasil yang baik (< 15%). Uji presisi konsentrasi 12,216 µg/mL dan 40,7601 µg/mL dilakukan bersamaan dengan pembuatan kurva kalibrasi, sementara konsentrasi 3,597 µg/mL dilakukan pada hari yang berbeda. Perbedaan hari pelaksanaan dikarenakan keterbatasan waktu dan tenaga.

Dari hasil pengujian presisi terlihat bahwa ketika sampel diolah secara triplo, selalu diperoleh satu hasil yang menyimpang cukup jauh. Penyimpangan tersebut diperkirakan karena pengaruh panas yang kurang

homogen pada penangas air. Karena terjadi perbedaan panas, maka reaksi yang terjadi pun berbeda-beda.

Validasi yang terakhir dilakukan adalah uji stabilitas. Uji stabilitas dilakukan untuk mengetahui stabilitas vitamin C dalam matriks bila terdapat masa penyimpanan. Waktu pelaksanaan uji stabilitas disesuaikan dengan waktu yang diperlukan untuk pengumpulan sampel, yaitu sepuluh jam. Kondisi penyimpanan pun bervariasi, pada suhu ruang, lemari pendingin, dan freezer. Perbedaan kondisi tersebut ditujukan untuk melihat kondisi optimum penyimpanan larutan.

Larutan dengan konsentrasi tinggi, 40,05 g/mL yang disimpan pada suhu ruang, kulkas, dan freezer memberikan kenaikan serapan bila dibandingkan serapan larutan segar. Kenaikan terjadi karena pada saat penyimpanan terjadi reaksi oksidasi. Oleh karena itu, reaksi dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin saat inkubasi akan lebih cepat, sehingga menghasilkan serapan yang lebih besar.

Larutan konsentrasi sedang yang disimpan pada suhu ruang, kulkas, dan freezer memberikan penurunan serapan dibandingkan serapan larutan segar. Hal tersebut terjadi karena pada larutan baru, serapan yang diberikan sangat tinggi karena saat penambahan asam sulfat 12 M dingin, suhu tabung menjadi lebih tinggi daripada suhu tubuh. Sementara pada larutan yang disimpan, walaupun telah terjadi oksidasi, tetapi lebih kecil bila dibandingkan dengan serapan larutan segar.

Y

Suhu sangat berpengaruh terhadap stabilitas. Dari hasil percobaan yang dilakukan, penyimpanan di dalam freezer memperlihatkan stabilitas yang paling baik. Oleh karena itu, sebagai alternatif, sampel dapat disimpan dahulu di dalam freezer.

Y

2. Analisis vitamin C dalam tubuh

Y

Y

Y

a. Penetapan kadar vitamin C dalam urin *In vivo*

Y

Sediaan yang diujikan berupa tablet hisap. Pemilihan sediaan bukan dikarenakan bentuknya. Tujuan penelitian adalah melihat terjadinya perubahan waktu paruh vitamin C dalam tubuh yang diberikan dalam dosis tinggi. Sediaan yang mengandung 500 mg vitamin C umumnya tersedia dalam bentuk tablet hisap. Selain itu, penulis memilih sediaan tersebut karena merek sediaan tersebut sering dikonsumsi.

Hasil analisis vitamin C dalam tubuh pada menit ke-100 dan 120 berada di bawah batas kuantitasi. Hasil analisis berada di bawah batas kuantitasi karena pada menit ke-100 – 120 masih terjadi fase absorpsi, sehingga eliminasi masih sedikit. Karena berada di bawah batas kuantitasi, maka data pada menit 100 dan 120 tidak dapat digunakan. Data yang digunakan untuk perhitungan selanjutnya yaitu data dari menit ke-150 hingga menit ke-600.

Y

Y

Y

Y

b. Perubahan waktu paruh vitamin C dalam tubuh

Y

Nilai dD/dt dapat digunakan untuk menggambarkan konsentrasi yang terdapat di dalam plasma. Ketika terjadi penurunan nilai dD/dt yang curam, berarti terjadi penurunan konsentrasi vitamin C dalam tubuh dengan cepat. Oleh karena itu, pemberian vitamin C hanya sekali karena dengan penurunan konsentrasinya dalam tubuh, sama dengan memberikan vitamin C dalam dosis yang rendah.

Dari Gambar 7 terlihat bahwa terjadi fluktuasi nilai dD/dt pada t_{mid} 165-365 menit. Hal tersebut umum terjadi dalam pengujian untuk data biologis. Jika jumlah sampel banyak, maka dapat diperoleh hasil yang baik dan tidak berfluktuasi. Oleh karena itu, dalam penelitian yang dilakukan penulis, nilai waktu paruh yang diperoleh tidak dapat digeneralisasikan untuk setiap individu.

Fluktuasi yang terjadi menyebabkan waktu paruh ikut berfluktuasi. Ketika kurva menaik, maka waktu paruh menjadi naik, ketika kurva menurun, waktu paruh pun ikut turun. Karena fluktuasi tersebut, maka data yang digunakan untuk melihat perubahan waktu paruh hanya data dD/dt pada t_{mid} 365-560 menit. Dari t_{mid} 365-430 terjadi penurunan nilai dD/dt yang curam, sementara dari t_{mid} 430-560 penurunan nilai dD/dt mulai linier. Perubahan yang terjadi adalah dalam skala logaritma. Berarti terjadi perubahan nilai konstanta eliminasi, k , yang akhirnya menyebabkan perubahan waktu paruh. Dari hasil perhitungan, perubahan waktu paruh

Y

antara kedua periode tersebut sekitar 5 kali. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa vitamin C memiliki sifat farmakokinetik nonlinier pada dosis tinggi.

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y

Y



BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Berdasarkan uji linieritas, batas kuantitasi, dan presisi, metode analisis vitamin C dalam urin in vitro dengan menggunakan larutan pereaksi 2,4-Dinitrofenilhidrazin – tiourea – copper sulfat (DTC) merupakan metode yang valid sehingga dapat digunakan untuk analisis vitamin C dalam urin in vivo.
2. Waktu paruh vitamin C yang diberikan pada dosis tinggi lebih pendek dibandingkan dengan waktu paruh vitamin C yang diberikan pada dosis rendah.

B. SARAN

1. Untuk penelitian selanjutnya, diusahakan menggunakan alat yang telah dikalibrasi.
2. Untuk mendapatkan nilai waktu paruh yang valid, maka digunakan jumlah relawan minimal enam orang, dan metode yang lebih sensitif, misalnya kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

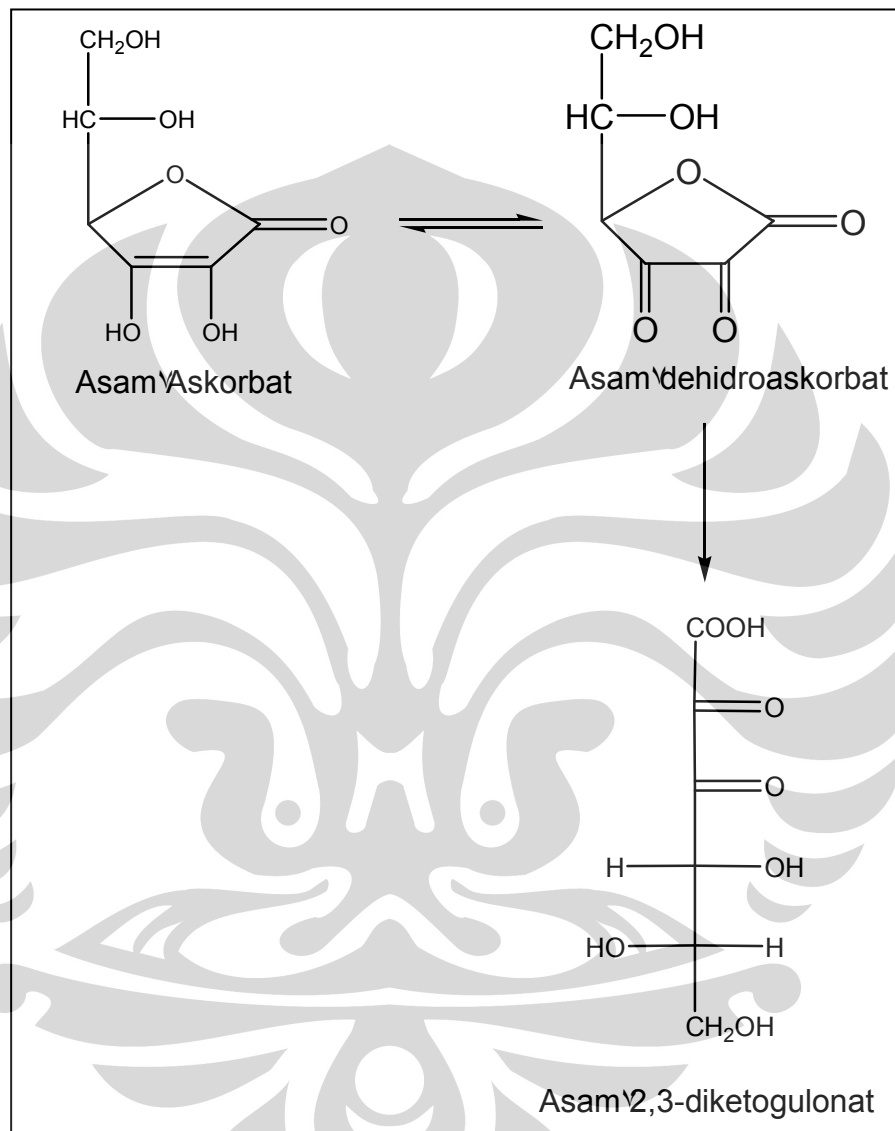


DAFTAR ACUAN

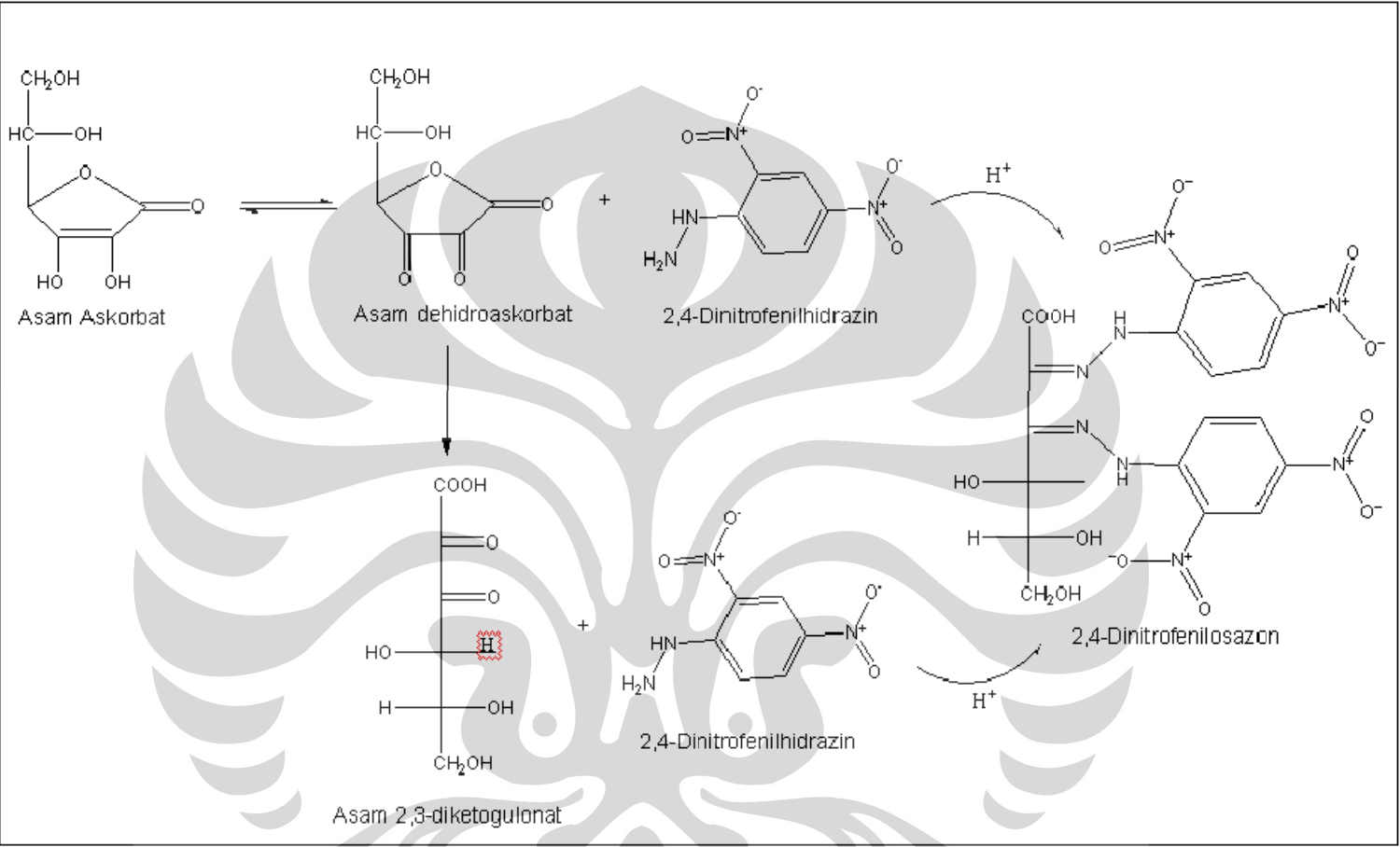
1. Sweetman, S (ed). Martindale: The Complete Drug Reference 35th. [Perangkat lunak komputer]. London: Pharmaceutical Press, 2007.
2. Eschleman, M. Introductory Nutrition and Diet Therapy. USA: Lippincott, 1984: 155-157.
3. Hasil penelusuran informasi obat. www.dechacare.com [cited: January 14th 2009. 14:26]
4. Shargel, L, Wu-Pong, S & Yu, A. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics 5th ed. [Perangkat lunak komputer]. Virginia: McGraw-Hill's Access Pharmacy, 2004.
5. Gilman, A (ed). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 7th ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1985: 1567-1570.
6. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Indonesia edisi 4. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995: 39.
7. The Department of Health. British Pharmacopoeia 2007. [Perangkat lunak komputer]. London: The Stationery Office, 2006.
8. Nollet, Leo ML. Food Analysis by HPLC. New York : Marcel Dekker, Inc., 1992: 345-363.
9. Reynolds, JEF (ed). Martindale: The Extra Pharmacopoeia 28th. London: The Pharmaceutical Press, 1982: 1653-1657.
10. Zetler, G, Seidel, G, Siegers, CP & Iven, H. Pharmacokinetics of Ascorbic Acid in Man. J. Clin. Pharmacol., 10, 1976: 273-282.
11. Khalid, I, Khan, A & Khattak MM. Biological significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health – A Review. Pakistan Journal of Nutrition, 3 (1), 2004: 5-13.

12. Atkins, G, Dean, BM, Griffin, W & Watts RWE. Quantitative Aspects of Ascorbic Acid Metabolism in Man. *The Journal of Biological Chemistry*, 239 (9), 1964: 2975-2980.
13. Shargel, L, Wu-Pong, S & Yu, A. *Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan*. Terj. dari *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, oleh Fasich & Sjamsiah S. Surabaya: Penerbit Universitas Airlangga, 1985: 177.
14. Levine, M, et al. Vitamin C Pharmacokinetics in Healthy Volunteers: Evidence for a new recommended dietary allowance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1996: 3704-3709.
15. Davies, M, Austin, J & Partridge D. *Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1991: 115-120.
16. Sonnenworth, A & Jaret, L. *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis Volume One (8th Ed)*. Mosby: St. Louis, 1980: 370-372.
17. Zloch, Z, Cerven, J & Ginter, E. radiochemical Evaluation of the 2,4-Dinitrophenylhydrazine Method for Determination of Vitamin C. *Anal. Biochem.* 43, 1971: 99-106.
18. Al-Ani, M, Opara, LU, Al-Bahri, D & Al-Rahbi, N. Spectrophotometric quantification of ascorbic acid contents of fruit and vegetables using the 2,4-dinitrophenylhydrazine method. *J. Food, Agri & Envi.* 5 (3&4), 2007: 165-168.
19. Padayatty, S, et al. Vitamin C Pharmacokinetics: Implications for Oral and Intravenous Use. *Ann Intern Med* 140, 2004: 533-537.
20. U. S. Department of Health and Human Services. *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*. Rockville: Food And Drug Administration, 2001: 1-10.
21. ICH Expert Working Group. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. 2005: 6-13.
22. Harmita. *Kapita Selektta Kimia Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.

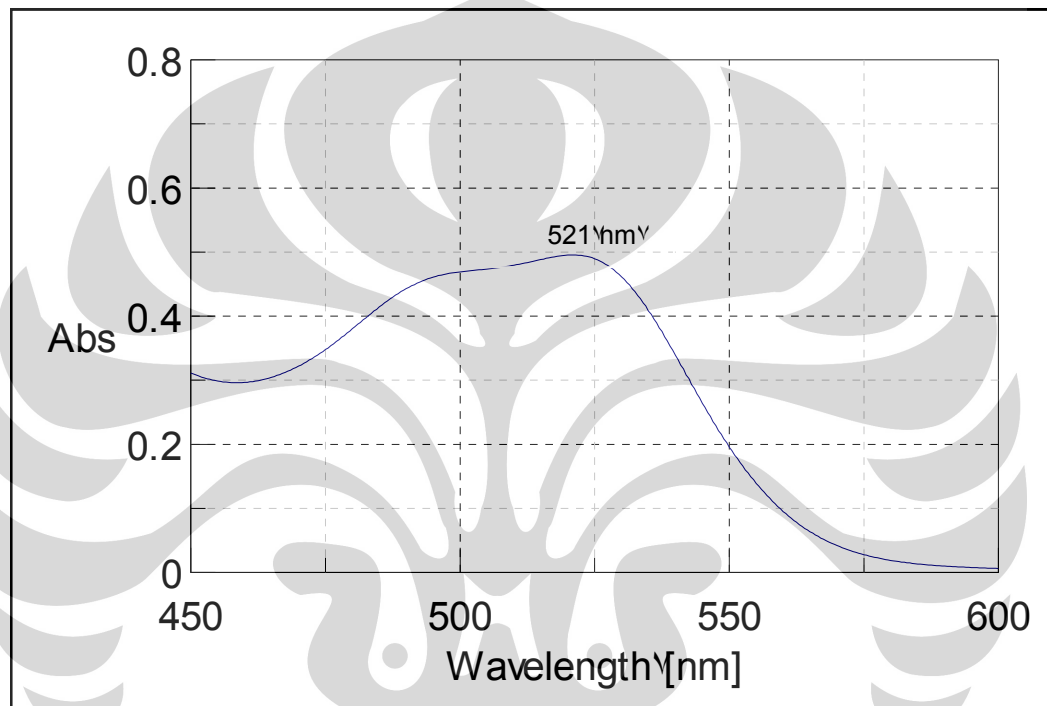




Gambar 1. Struktur asam askorbat dan oksidasinya menjadi asam dehidroaskorbat dan asam 2,3-diketogulonate



Gambar 2. Reaksi antara asam dehidroaskorbat dan asam 2,3-diketogulonat dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin menghasilkan 2,4-dinitrofenilosazon



Gambar 3. Kurva serapan vitamin C sebagai senyawa 2,4-dinitrofenilosazon

Y

Y

Y

Y

Y

Y

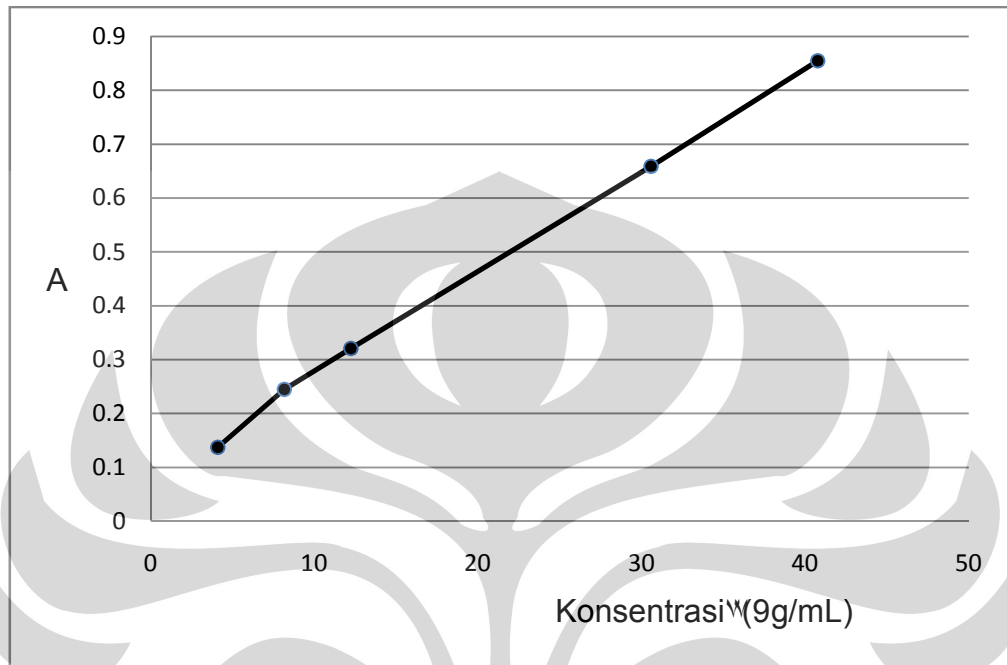
Y

Y

Y

Y

Y

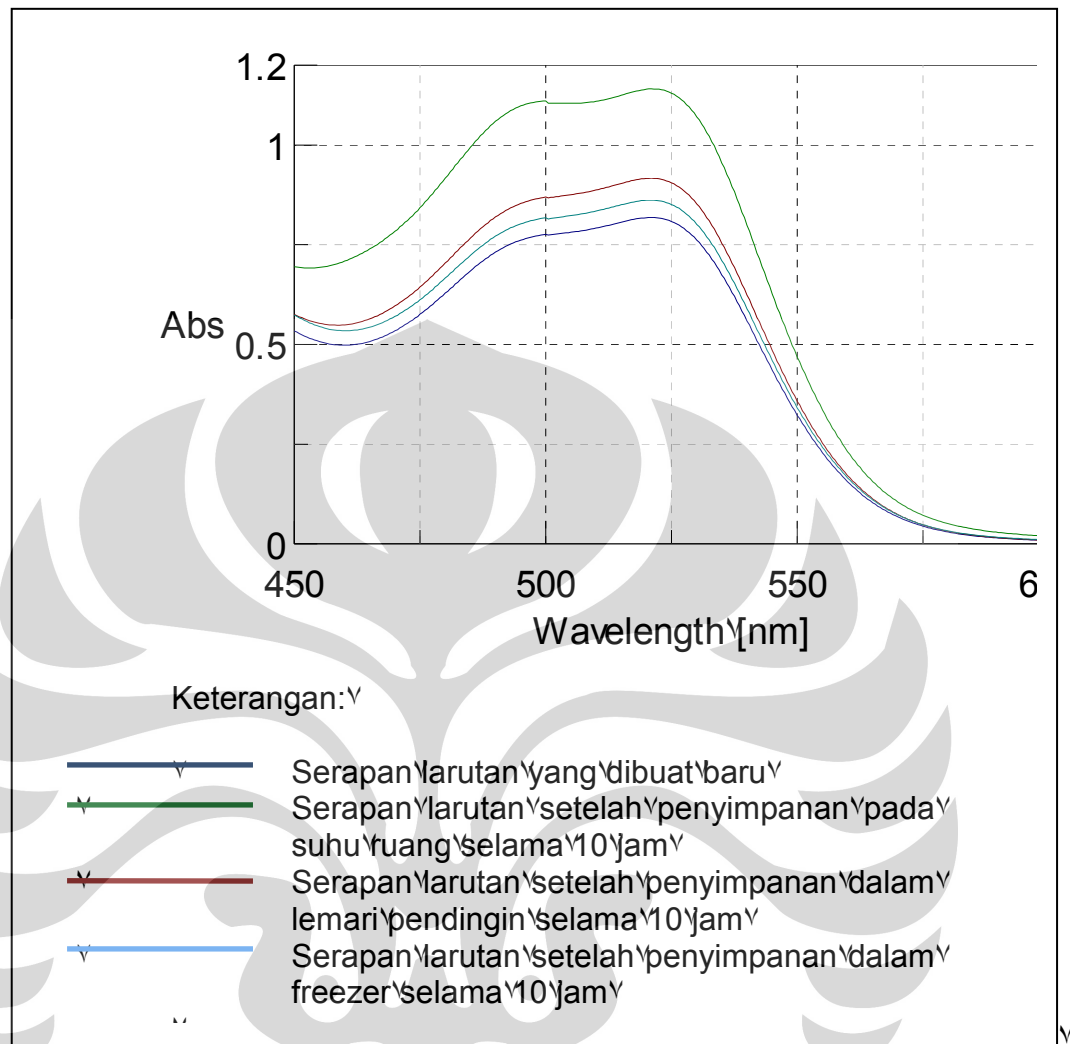


Gambar 4. Kurva Kalibrasi vitamin C dalam pelarut campuran urin dan asam trikloroasetat (1:4)

Keterangan:

Persamaan kurva kalibrasi: $y = 0,019x + 0,076$, dengan koefisien korelasi, $r = 0,9992$.

Y



Gambar 5. Kurva serapan uji stabilitas vitamin C konsentrasi 40,059 g/mL dalam pelarut campuran urin dan asam trikloroasetat (1:4)

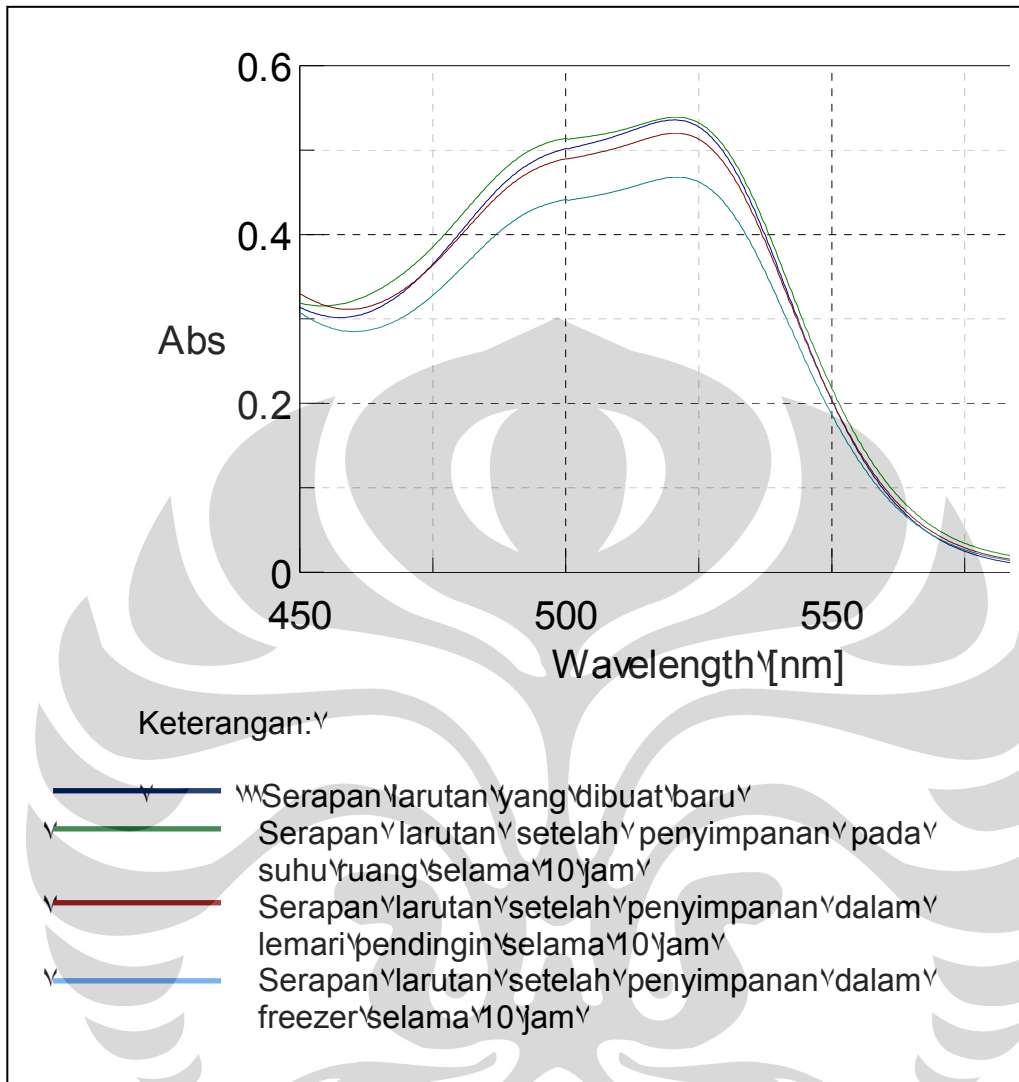
Y

Y

Y

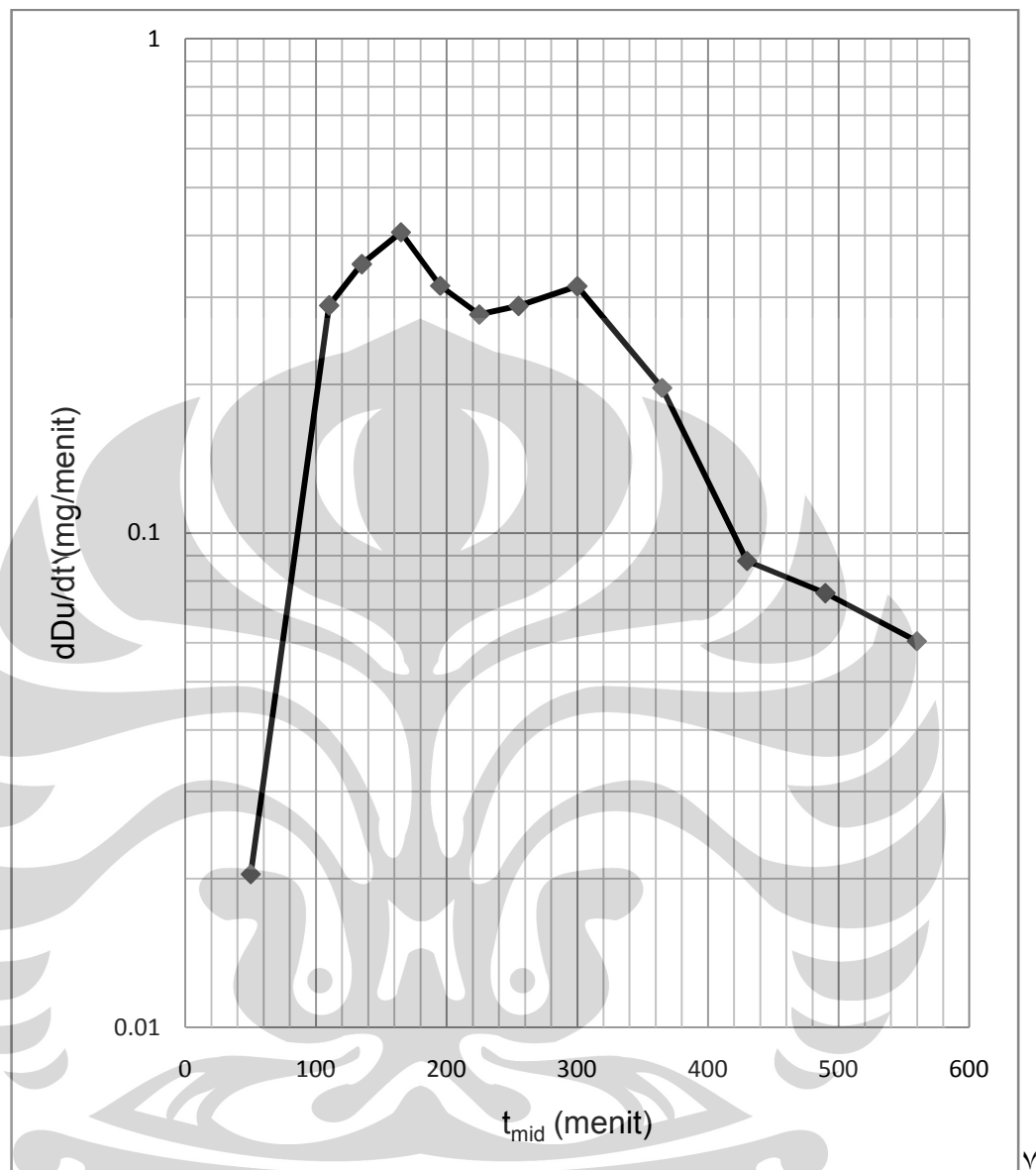
Y

Y

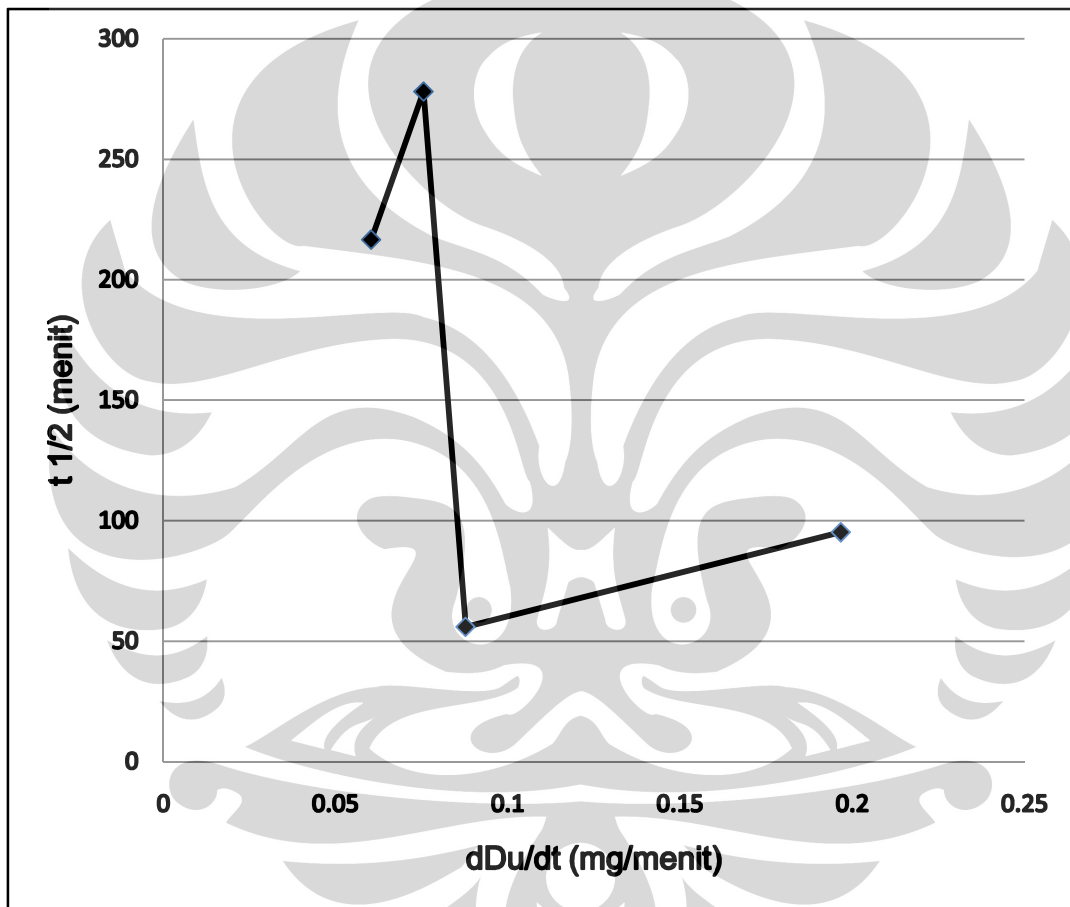


Gambar 6. Kurva serapan uji stabilitas vitamin C konsentrasi 20,0199 g/mL dalam pelarut campuran urin dan asam trikloroasetat (1:4)

Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y



Gambar 7. Hubungan antara perubahan jumlah obat dalam urin per satuan waktu (dDu/dt) dengan waktu tengah antara pengambilan sampel (t_{mid})



Gambar 8. Grafik hubungan antara dDu/dt dengan t_{1/2}

Y
Y
Y
Y
Y
Y



Gambar 8. Penangas air Memmert WNB7-45

Y
Y
Y
Y
Y
Y

Y

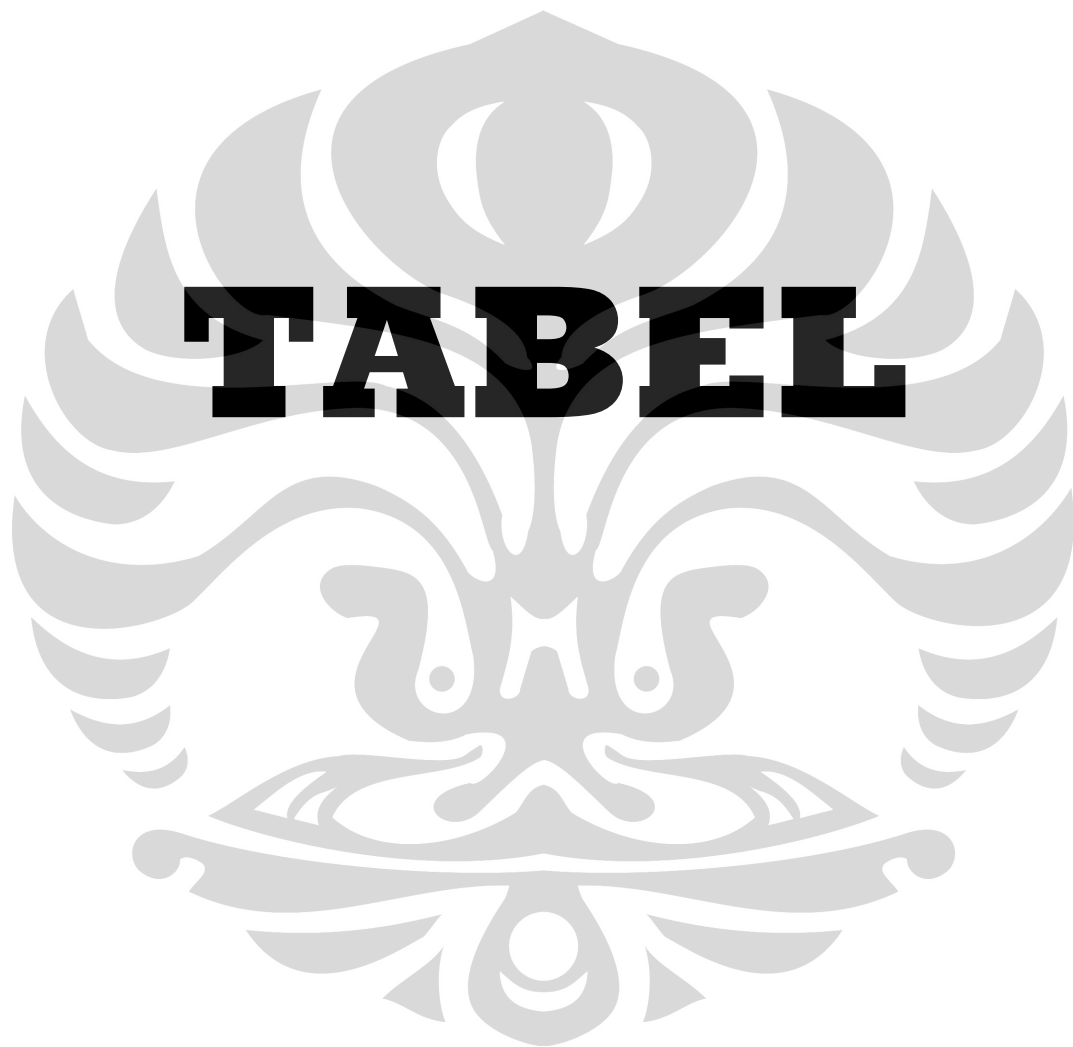
50
Y

Y
Y
Y
Y
Y



Gambar 9. Spektrofotometri Jasco W-530

Y
Y
Y
Y
Y



Tabel 1
 Pengaruh waktu pendiaman hasil inkubasi pada suhu ruang setelah penambahan asam sulfat 12 M

Konsentrasi (µg/mL)	Waktu pendiaman (menit)	A	A rata-rata	Sampel yang dipakai dalam perhitungan	Simpangan Baku	KV (%)
14,96	20	0,43155	0,436	20#30	0,00339	0,777
	21	0,43709	0,4355	20#29	0,00319	0,731
	22	0,43238	0,4351	20#28	0,00303	0,698
	23	0,43411	0,4346	20#27	0,00281	0,647
	24	0,43727	0,4341	20#26	0,00256	0,589
	25	0,43558	0,4336	20#25	0,0025	0,576
	26	0,43667	0,4336	20#24	0,00258	0,595
	27	0,43835	0,4322	20#23	0,00142	0,330
	28	0,43912	Y	Y	Y	Y
	29	0,43952	Y	Y	Y	Y
	30	0,44061	Y	Y	Y	Y

Keterangan:

Sampel yang dipakai mengacu kepada banyak sampel yang dimasukkan dalam perhitungan, sesuai dengan waktunya.

Tabel 2
Pembuatan kurva kalibrasi dan pengujian linearitas

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	A
4,076	0,1371
8,152	0,2447
12,216	0,3206
30,57	0,6586
40,76	0,8548

Persamaan garis kurva kalibrasi: $y = 0,019x + 0,076$ dengan koefisien korelasi, r , adalah 0,9992.

Tabel 3
Hasil perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	A	y_i	$(y_i)^2$
4,076	0,1371	0,1534	0,0003
8,152	0,2447	0,2309	0,0002
12,216	0,3206	0,3081	0,0002
30,57	0,6586	0,6568	$3 \cdot 10^{-6}$
40,76	0,8548	0,8504	$2 \cdot 10^{-5}$
		Jumlah	0,0006

$S(y/x) = 0,014$

$\text{LOD} = 2,2105 \mu\text{g/mL}$

$\text{LOQ} = 7,368 \mu\text{g/mL}$

Tabel 4
Hasil perhitungan uji presisi

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	A	A rata-rata	Simpangan baku	Koefisien Variasi (%)
3,597	0,1453 0,1465 0,1509	0,14756	0,003	2,01
12,216	0,3359 0,3206 0,316	0,32416	0,01	3,21
40,76	0,8548 0,8539 0,8825	0,86375	0,016	1,88

Tabel 5
Hasil uji stabilitas vitamin C dalam larutan campuran urin dan asam
trikloroasetat (1:4)

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kondisi	t (jam)	A	A (t=0)	ΔA	% diff
20,01	Ruang	10	0,53908	0,554185	0,01511	2,7256
	Kulkas		0,5201		0,03409	6,1505
	Freezer		0,46801		0,0862	15,5499
40,05	Ruang	10	1,1405	0,814885	0,3256	39,96
	Kulkas		0,9166		0,1017	12,48
	Freezer		0,8619		0,047	5,765

Tabel 6
Penetapan kadar vitamin C dalam urin
Y

t (menit) Y	A rata-rata Y	Konsentrasi Y diperoleh (µg/mL) Y	Konsentrasi Y dalam urin Y (µg/mL) Y
100 Y	0,121655 Y	2,40289 Y	12,0145 Y
120 Y	0,20983 Y	7,04368 Y	35,2184 Y
150 Y	0,25175 Y	9,25 Y	46,25 Y
180 Y	0,32612 Y	13,16421 Y	85,8211 Y
210 Y	0,31642 Y	12,65368 Y	63,2684 Y
240 Y	0,33897 Y	13,84053 Y	69,2026 Y
270 Y	0,33255 Y	13,5026 Y	67,5132 Y
330 Y	0,39596 Y	16,84 Y	84,2 Y
400 Y	0,6266 Y	28,9789 Y	144,8947 Y
460 Y	0,79097 Y	37,63 Y	188,15 Y
520 Y	0,56159 Y	25,5574 Y	127,7868 Y
600 Y	0,34227 Y	14,0142 Y	70,0711 Y

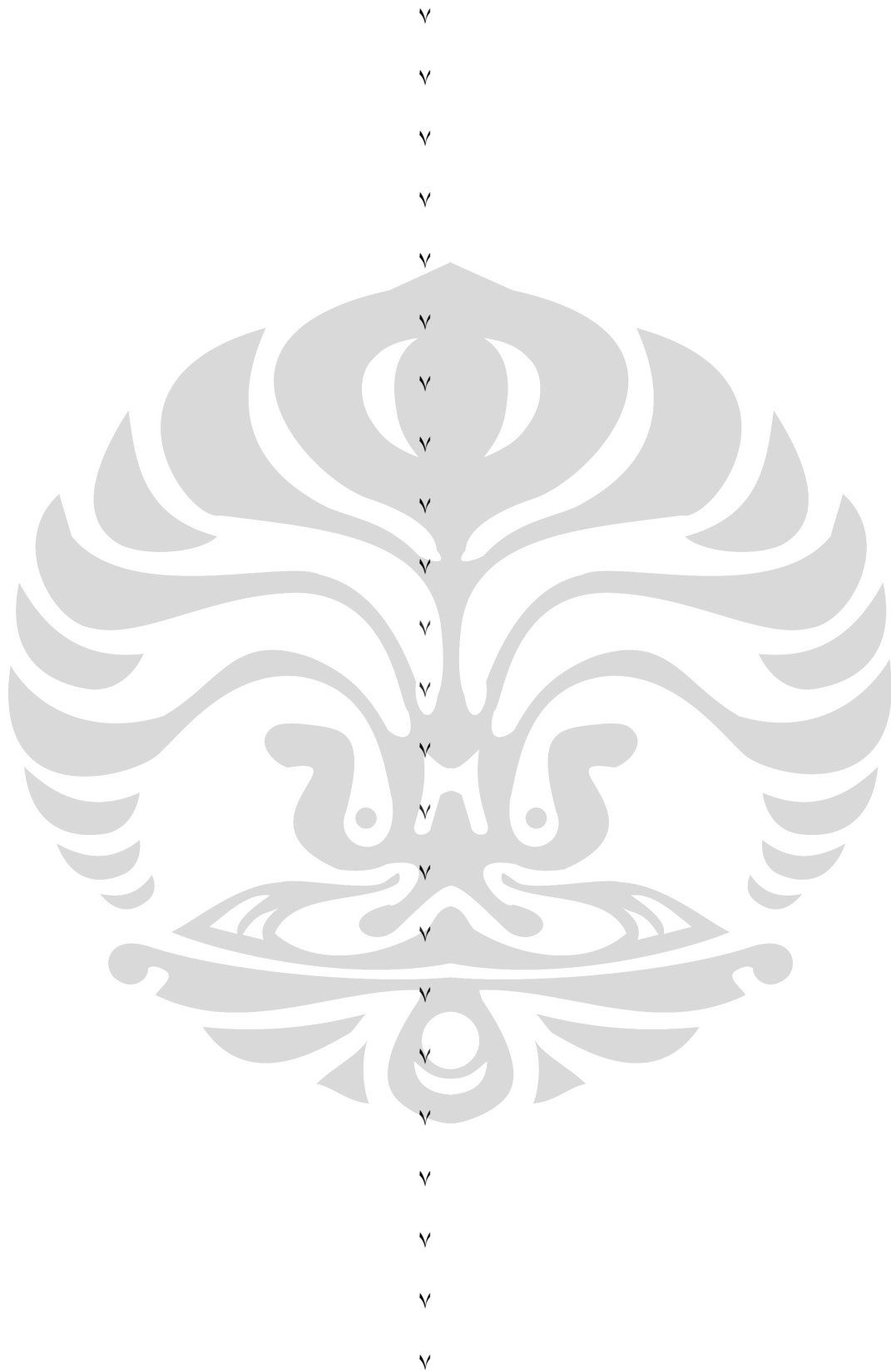
Keterangan: Y

Untuk perhitungan konsentrasi obat di dalam urin, maka konsentrasi obat Y yang diperoleh dikali lima. Y

Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y
Y

Tabel 7
Perhitungan waktu paruh berdasarkan data urin

t^y (menit) ^y	Konsentrasi ^y dalam urin ^y ($\mu\text{g/mL}$) ^y	Volume ^y urin ^y (mL) ^y	Du^y (mg) ^y	dDu/dt^y (mg/menit) ^y	t_{mid}^y (menit) ^y	k^y (menit [#]) ^y	t^y (menit) ^y
100	12,0145	170	2,0425	0,0204	50		
120	35,2184	164	5,7758	0,2888	110	#0,0442	#15,697
150	46,25	227	10,499	0,3499	135	#0,0077	#0,182
180	85,8211	185	12,177	0,4059	165	#0,005	#140,2
210	63,2684	150	9,4903	0,3163	195	0,0083	83,4022
240	69,2026	120	8,3043	0,2768	225	0,00445	155,741
270	67,5132	128	8,6417	0,2881	255	#0,0013	#522,07
330	84,2	225	18,945	0,3158	300	#0,002	#339,72
400	144,8947	95	13,765	0,1966	365	0,0073	95,1196
460	188,15	28	5,2682	0,0878	430	0,0124	55,867
520	127,7868	35,5	4,5364	0,0756	490	0,0025	278,038
600	70,0711	69	4,8349	0,0604	560	0,0032	216,599
		Jumlah	104,28				





LAMPIRAN

Lampiran 1
Cara Perhitungan Simpangan Baku dan Koefisien Variasi

Rata-rata

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Simpangan Baku

$$SB = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Koefisien Variasi

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

Contoh

Hasil Uji presisi standar vitamin C 40,76 g/mL

Serapan rata-rata: 0,86375

$$SB = \sqrt{\frac{(0,8548 - 0,86375)^2 + (0,8539 - 0,86375)^2 + (0,8825 - 0,86375)^2}{3-1}} = 0,016$$

$$KV = \frac{0,016}{0,86375} \times 100\% = 1,88\%$$

Lampiran 3
 Cara perhitungan kadar vitamin C dalam urin

Contoh:

Persamaan kurva kalibrasi: $y = 0,019x + 0,076$

Volume urin = 225 mL

Larutan dipipet 1 mL

Pengenceran dengan larutan asam trikloroasetat 10% = 5 kali

Pengenceran dengan larutan pereaksi DTC = 3 kali

A = 0,39596

Konsentrasi vitamin C dalam urin = $\frac{0,39596 - 0,076}{0,019} = 16,84$ g/mL

Kalikan dengan 5 = $16,84 \text{ g/mL} \times 5 = 84,2$ g/mL

Banyaknya vitamin C dalam 225 mL urin = $225 \text{ mL} \times 84,2 \text{ g/mL} = 18,945$ mg

Lampiran 4

Perhitungan waktu paruh dengan menggunakan data urin

v

v

v

Contoh:

v

Banyaknya obat dalam urin, D_u pada $t = 120 = 5,7758 \text{ mg}$

v

$$dD_u/dt_2 = \frac{D_u}{t_1 - t_2} = \frac{5,7758}{120 - 100} = 0,2888 \text{ mg/menit}$$

v

$$t_{mid2} = \frac{t_2 + t_1}{2} = \frac{120 + 100}{2} = 110 \text{ menit}$$

v

$$dD_u/dt_1 = 0,0204 \text{ mg/menit}$$

v

$$t_{mid1} = 50 \text{ menit}$$

v

$$k = \frac{\ln dD_u/dt_1 - \ln dD_u/dt_2}{t_{mid1} - t_{mid2}} = \frac{\ln 0,0204 - \ln 0,2888}{110 - 50} = -0,04415$$

v

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} = \frac{0,693}{-0,04415} = -15,697 \text{ menit}$$

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

v

Lampiran 5Y
Sertifikat Analisis Standar Vitamin C Y



石药集团 维生药业 (石家庄) 有限公司

Certificate of Analysis

Product: Ascorbic Acid Standard: BP2008/USP31
 Batch No.: 08115333 Quantity: 2000 kgs
 MFG Date: Nov.19, 2008 Expiry Date: Nov.18, 2011

Item	Analysis Standard	Result
Characteristics	White crystalline power	Pass
Identification	Positive Reaction	Pass
Melting Point	191~192°C	191.0°C
Specific Rotation	+20.5° ~ +21.5°	+21.2°
pH	2.1~2.6	2.4
Sulfated Ash	≤0.1%	0.04%
Assay	99.5~100.5%	99.7%
Loss of Drying	≤0.15%	0.09%
Heavy Metal	≤0.0003%	<0.0003%
Lead	≤2ppm	<2ppm
Clarity of Solution	Pass	Pass
Color of Solution	≤BY ₇	<BY ₇
Oxalate	≤0.2%	<0.2%
Copper Salt	≤0.0005%	<0.0005%
Ferrite	≤0.0002%	<0.0002%
Arsenic	≤0.0003%	<0.0002%
Organic Volatile Impurities	Pass	Pass

Result: The above product complies with BP2008/USP31 standard.

Manufacturer: Shijiazhuang Pharma. Weisheng Pharma. 石药集团维生药业(石家庄)有限公司

SHIJIAZHUANG PHARMA WEISHENG
PHARMACEUTICAL SHIJIAZHUANG CO., LTD.

冯 斌 斌
GENERAL MANAGER

