

**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN C TERHADAP PEMBENTUKAN
NITROSODIMETILAMIN PADA MENCIT JANTAN SETELAH
PEMBERIAN NATRIUM NITRIT DAN DIMETILAMIN**

AMBAR KURNIA EKA PUTRI

0305050051



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

**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN C TERHADAP PEMBENTUKAN
NITROSODIMETILAMIN PADA MENCIT JANTAN SETELAH
PEMBERIAN NATRIUM NITRIT DAN DIMETILAMIN**

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

Oleh:

AMBAR KURNIA EKA PUTRI

0305050051



DEPOK

2009

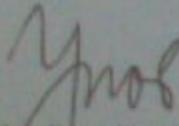
SKRIPSI : PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN C TERHADAP
PEMBENTUKAN NITROSODIMETILAMIN PADA MENCIT
JANTAN SETELAH PEMBERIAN NATRIUM NITRIT DAN
DIMETILAMIN

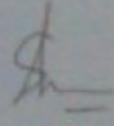
NAMA : AMBAR KURNIA EKA PUTRI

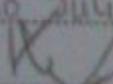
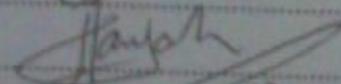
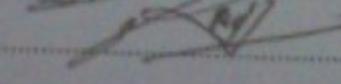
NPM : 0305050051

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2009


Dr. Yandiana Harahap, MS.
PEMBIMBING I


Santi Purna Sari, M.Si
PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana :	10 July 2009
Penguji I : Drs. Hayun, M.Si	
Penguji II : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si	
Penguji III : Dra. Rosmala Dewi	

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat, karunia, dan hidayahNya yang telah membantu dan menuntun penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini dengan baik.

Skripsi dengan judul Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Pembentukan Nitrosodimetilamin pada Mencit Jantan Setelah Pemberian Natrium Nitrit dan Dimetilamin ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Farmasi.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, yaitu kepada :

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku pembimbing I atas segala perhatian, bimbingan, saran, bantuan serta dukungan moril dan materil yang telah diberikan sampai terselesaikannya penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Santi Purna Sari, M.Si selaku pembimbing II atas bimbingan dan saran yang telah diberikan sampai terselesaikannya penelitian dan penyusunan skripsi ini.

3. Ibu Dr. Amarila Malik, M.Si selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama masa pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI,
4. Orang tua penulis yang telah memberikan kasih sayang, perhatian, doa, semangat, dan dukungan yang tidak terhingga kepada penulis.
5. Seluruh dosen dan laboran, serta seluruh karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI.
6. Sahabat terkasih penulis: Gina, Niken, Annis, Hasma, Muthia, dan Itine. Terima kasih atas kasih sayang, semangat, doa, dan perhatian yang diberikan kepada penulis. Semoga persahabatan ini akan terus terjalin.
7. Teman-teman Farmasi 2005, terutama yang tergabung dalam KBI Kimia Farmasi: Achil, Isabel, Nur, Fileas, Galih, Vania, Wahyu, Dessy, Bocah, Ventry dan Agus.
8. Semua pihak lain yang belum disebutkan, baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah banyak membantu penulis.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Besar harapan penulis bahwa skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis

2009

ABSTRAK

Nitrosamin merupakan suatu senyawa kimia yang telah banyak diteliti bersifat karsinogenik. Salah satu senyawa nitrosamin yang mempunyai potensi kuat sebagai karsinogenik adalah N-Nitrosodimetilamin (NDMA). *International Agency for Research on Cancer* menggolongkan NDMA ke dalam golongan 2A yaitu kemungkinan bersifat karsinogen terhadap manusia. Suatu senyawa yang telah banyak diteliti dapat mencegah pembentukan nitrosamin adalah vitamin C. Mekanisme penghambatan pembentukan nitrosamin oleh vitamin C adalah dengan mencegah terjadinya reaksi nitrosasi. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui jumlah vitamin C yang efektif menghambat nitrosasi *in vivo* menggunakan mencit. Analisis pembentukan NDMA pada mencit dilakukan dengan kromatografi gas detektor ionisasi nyala, dengan suhu injektor, detektor dan kolom berturut-turut 200°C, 220°C dan 130°C. Kadar NDMA yang terbentuk pada kelompok kontrol positif adalah 2,325 ppm. Sedangkan pada kelompok hewan yang mendapat vitamin C tidak terdeteksi adanya NDMA.

Kata kunci : karsinogenik, kromatografi gas, N-Nitrosodimetilamin, vitamin C.

ix+ 83 hlm; gbr; tabel; lamp.

Daftar acuan : 33 (1975-2006)

ABSTRACT

Nitrosamine is compound that have been researched has carcinogenic activity. One of this that highly potent as carcinogen is N-Nitrosodimethylamine (NDMA). *International Agency for Research on Cancer* classified NDMA in group 2A, means that this compound have possibility carcinogenic to human. Compound that have been known can inhibit nitrosation is ascorbic acid. Inhibiting mechanism of ascorbic acid is by inhibit the nitrosation reaction. However, its important to know the amount of ascorbic acid that effective to inhibit nitrosation, especially in vivo nitrosation. For that, we make this research to know the effective amount of ascorbic acid that can inhibit the formation of nitrosamine, especially NDMA. Analysis method of NDMA formation using Gas Chromatograph with flame ionize detector (FID). The GC injector, detector and oven temperatures were maintained at 200°C, 220°C and 130°C respectively. NDMA detected on control positive group is 2,325 ppm. While NDMA was not detectable in the groups were also treated with ascorbic acid.

Keyword : Ascorbic acid, carcinogenic, gas chromatography, N-Nitrosodimethylamine.

ix+ 83 p.g.; fig.; tab.; app.

Bibliography : 33 (1975-2006)

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.....	3
C. HIPOTESIS.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. NITROSAMIN.....	5
B. VITAMIN C.....	10
C. METODE ANALISIS SENYAWA NDMA.....	16
C. KROMATOGRAFI GAS.....	18
D. VALIDASI METODE ANALISIS.....	28
BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA.....	33
A. BAHAN.....	33
B. ALAT.....	34

	C. CARA KERJA.....	34
BAB IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
	A. HASIL.....	41
	B. PEMBAHASAN.....	43
BAB V.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
	A. KESIMPULAN.....	53
	B. SARAN.....	54
	DAFTAR ACUAN.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia umum nitrosamin.....	5
2. Reaksi pembentukan nitrosamin (NDMA).....	6
3. Rumus struktur N-Nitrosodimetilamin (NDMA).....	9
4. Struktur kimia vitamin C.....	10
5. Mekanisme penghambatan nitrosasi oleh vitamin C.....	14
6. Alat kromatografi Shimadzu GC-17A.....	61
7. Pengambilan darah mencit melalui sinus orbital.....	62
8. Kromatogram standar NDMA pada kondisi analisis terpilih.....	63
9. Kurva kalibrasi standar NDMA.....	64
10. Kromatogram NDMA pada sampel darah mencit kelompok kontrol positif.....	65

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perlakuan untuk orientasi dosis NaNO ₂	37
2. Perlakuan untuk orientasi waktu pembentukan NDMA maksimum....	38
3. Pembagian kelompok perlakuan mencit.....	39
4. Pemilihan kondisi optimum untuk analisis NDMA dalam diklormetan Dengan variasi suhu kolom dan kecepatan alir gas pembawa.....	69
5. Data kurva kalibrasi standar NDMA.....	70
6. Data linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi NDMA.....	71
7. Data uji presisi NDMA.....	72
8. Data uji perolehan kembali NDMA.....	73
9. Data penetapan kadar NDMA pada tiap-tiap kelompok mencit.....	74

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara memperoleh persamaan regresi linear.....	77
2. Cara perhitungan uji presisi.....	78
3. Cara perhitungan uji perolehan kembali.....	79
4. Cara perhitungan batas deteksi, batas kuantitasi dan linearitas.....	80
5. Cara perhitungan kadar NDMA dalam sampel.....	81
6. Sertifikat analisis standar NDMA.....	82
7. Sertifikat analisis vitamin C.....	83

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Nitrosamin merupakan senyawa nitroso yang diketahui bersifat karsinogenik. Senyawa nitrosamin terdapat di air, tanah dan udara. Senyawa ini dapat ditemukan mengontaminasi makanan, obat-obatan, kosmetik dan pestisida (1). Senyawa ini di dalam makanan terutama terdapat dalam makanan yang diawetkan dengan pengawet yang mengandung nitrat atau nitrit seperti daging dan ikan.

Nitrosamin dapat terbentuk baik *in vitro* (dalam bahan makanan dan lain-lain) maupun *in vivo* (2). Pembentukan nitrosamin di dalam tubuh manusia maupun hewan (*in vivo*) lebih berperan dalam menimbulkan gangguan terhadap kesehatan (3). Senyawa amin yang terkandung dalam daging ikan dan hewan lain dapat bereaksi dengan nitrit membentuk nitrosamin. Selain terbentuk nitrosamin, juga tertinggal residu nitrit, yang pada pH lambung dapat bereaksi dengan senyawa amin membentuk nitrosamin. Sisa nitrit yang tidak bereaksi tidak dapat dicerna dan dapat tertinggal pada ginjal atau dipecah oleh bakteri-bakteri di dalam usus menimbulkan gas nitrogen (4).

Berbahayanya senyawa nitrosamin bagi kesehatan karena sifat karsinogeniknya. Senyawa nitrosamin terutama menyebabkan kanker pada

saluran pencernaan dan saluran kandung kemih. Selain itu, juga dapat menyebabkan kanker pada hati, saluran pernapasan, dan jaringan reproduksi (5). Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk membuktikan sifat karsinogenik dari senyawa nitrosamin.

Oleh karena sifat karsinogenik yang berbahaya dari senyawa nitrosamin, maka perlu dilakukan tindakan untuk mencegah terbentuknya senyawa tersebut. Salah satunya dapat dilakukan dengan memberikan senyawa/zat yang dapat menghambat pembentukan nitrosamin. Salah satu senyawa yang diketahui mempunyai aktivitas untuk menghambat pembentukan nitrosamin adalah vitamin C. Vitamin ini digunakan untuk menghambat reaksi nitrosasi di dalam makanan (*in vitro*) dan *in vivo* (2, 6). Dengan dihambatnya proses nitrosasi ini diharapkan dapat menghambat pembentukan senyawa nitrosamin yang berbahaya, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Pemberian vitamin C bersamaan dengan nitrit dan amin atau amida pada hewan percobaan menunjukkan adanya penghambatan pembentukan senyawa N-nitroso (6). Leaf dan kawan-kawan melakukan penelitian mengenai efek dari peningkatan dosis vitamin C terhadap pembentukan N-nitrosoprolin di lambung manusia. Ditemukan bahwa dosis rendah dari vitamin C dapat menghambat pembentukan N-nitrosoprolin (6). Itu berarti dengan semakin meningkatnya dosis vitamin C yang diberikan maka akan semakin efektif untuk menghambat pembentukan nitrosamin.

Kemampuan vitamin C untuk menghambat pembentukan nitrosamin ini yang mendasari penelitian mengenai pengaruh pemberian vitamin C secara oral terhadap pembentukan nitrosamin, dalam hal ini N-Nitrosodimetilamin (NDMA) pada mencit, dimana akan dilihat jumlah vitamin C yang cukup untuk menghambat NDMA setelah penambahan sejumlah prekursor.

Metode yang akan digunakan untuk analisis NDMA dalam penelitian ini adalah kromatografi gas. Metode ini merupakan metode yang paling sering digunakan di laboratorium penelitian dan industri. Hal ini disebabkan oleh tingkat keberhasilan yang tinggi, waktu analisis yang cepat, sensitivitas yang tinggi pada sistem detektor, efisiensi pemisahan yang baik, mampu menganalisis sampel dengan matriks yang kompleks, dan jumlah sampel yang diperlukan untuk analisis relatif sedikit dimana sampel yang dianalisis harus dapat menguap pada suhu analisis.

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Memperoleh kondisi optimum untuk penetapan kadar NDMA dalam darah mencit.
2. Menetapkan kadar NDMA yang terbentuk secara *in vivo* pada mencit.
3. Mengetahui pengaruh pemberian dengan dosis berbeda dari vitamin C terhadap pembentukan NDMA.

C. HIPOTESIS PENELITIAN

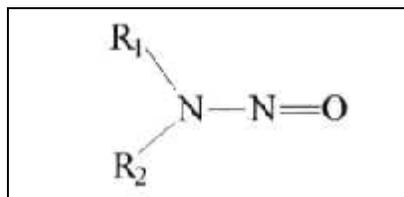
Vitamin C dapat menghambat pembentukan nitrosamin secara *in vivo* dan semakin besar dosis vitamin C yang diberikan semakin kecil jumlah nitrosamin yang terbentuk.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. NITROSAMIN

Nitrosamin merupakan senyawa yang mempunyai rumus umum :

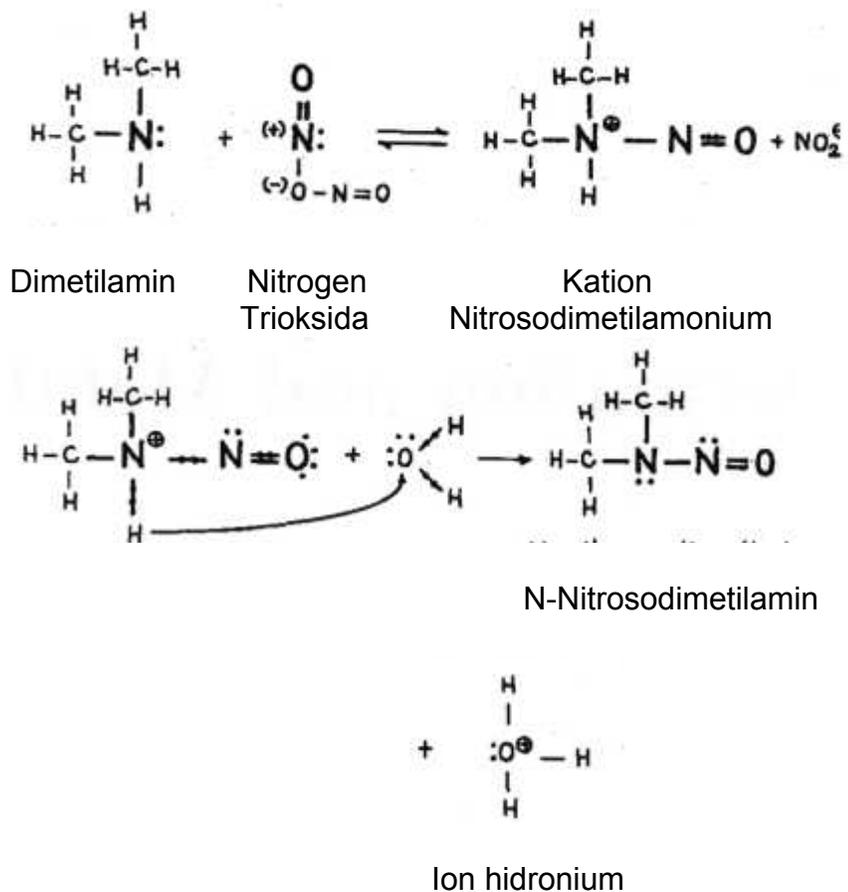


Gambar 1. Rumus struktur N-nitrosamin

dimana R₁ dan R₂ adalah gugus alkil atau aril. Nitrosamin diabsorpsi melalui kulit, udara dan saluran cerna. Ada bukti yang menunjukkan bahwa senyawa nitroso mungkin terbentuk secara *in vivo* dari nitrit atau nitrat dan amin primer, sekunder dan tersier dalam organ manusia yang tidak terpapar senyawa ini (1).

Umumnya nitrosamin dibagi dalam dua kelompok, yaitu nitrosamin volatil dan non-volatil. Nitrosamin volatil adalah grup nitrosamin yang relatif non-polar dan mempunyai berat molekul yang rendah, misalnya NDMA (N-Nitrosodimetilamin), NDEA (N-Nitrosodietilamin), NPIR (N-Nitrosopirolidin), NPIP (N-Nitrosopiperidin), dan N-Nitrosotiazolidin. Sedangkan nitrosamin non-volatil adalah grup nitrosamin yang bersifat polar dan mempunyai berat molekul lebih tinggi, misalnya N-Nitrosoprolin dan N-Nitrosodietanolamin (7).

N-nitrosamin terbentuk dari reaksi substitusi elektrofilik dari nitrogen organik dengan *nitrosating agent*. Nitrogen organik diturunkan dari amin primer; sekunder; dan tersier, hidroksilamin atau amin peroksida. Suatu *nitrosating agent* (N_2O_3) dapat dibentuk dari nitrit (NO_2^-), nitrat (NO_3^-), atau senyawa nitro ($-C-NO_2$). Pada senyawa amin, kation nitrosonium (NO^+) diturunkan dari nitrogen trioksida (N_2O_3) menyerang sepasang elektron pada nitrogen amin, menghasilkan kation nitrosoammonium dan anion nitrit. Reaksi dari kation nitrosoammonium bergantung pada struktur kimianya, sifat dari senyawa nitroso, dan kondisi reaksi (1).



Gambar 2. Reaksi pembentukan nitrosamin (N-Nitrosodimetilamin)

Pembentukan nitrosamin dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti konsentrasi reaktan, keasaman, suhu, lama penyimpanan, kebiasaan dari amin, adanya katalisator atau inhibitor (1, 8). Makin tinggi konsentrasi nitrit dan senyawa amin, makin mudah terjadi pembentukan nitrosamin. Pada kondisi asam (pH rendah), pemanasan pada suhu tinggi atau makin lama penyimpanan bahan-bahan yang mengandung nitrit dan amin akan meningkatkan pembentukan nitrosamin. Anion tiosianat, klorida, bromida, iodida, formaldehida, serta senyawa karbonil lain, merupakan katalisator reaksi nitrosasi. Menurut penelitian di Denmark, risiko nitrat dalam air minum lebih besar daripada risiko nitrat dalam sayur-sayuran dalam meningkatkan nitrosasi endogen, karena di dalam sayur-sayuran terdapat vitamin C, suatu inhibitor nitrosasi yang kuat. Pada konsumen teh atau kopi, terdapat senyawa fenolik konsentrasi tinggi yang merupakan inhibitor reaksi nitrosasi, sehingga nitrosasi menurun, terutama pada pH rendah (8).

Pada non perokok, masukan nitrat merupakan determinan pembentukan senyawa endogen senyawa N-nitroso, sedangkan pada perokok, nitrosasi endogen tidak ditentukan oleh masukan nitrat saja, karena tiosianat kadar tinggi dalam saliva perokok meningkatkan nitrosasi endogen, tetapi pada saat yang sama masukan nitrat mengurangi *flow of recirculated nitrat* dalam saliva (9).

Amin aromatik dan alifatik primer pada pH dan suhu rendah tidak dapat membentuk senyawa nitroso, dan reaksi dengan nitrit dijalankan oleh garam diazonium. Kecepatan pembentukan senyawa N-nitroso dari amin

sekunder meningkat seiring dengan menurunnya kebasaaan dari amin tersebut. Amin alifatik tersier tidak bereaksi dengan N_2O_3 pada pH asam kuat, akan tetapi peningkatan pH dan suhu menjalankan proses nitrosasinya (1).

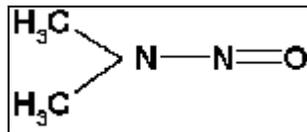
Nitrosamin stabil pada kondisi di dalam organisme, sebelum akhirnya didegradasi. Nitrosamin mencapai hati melalui aliran darah. Dalam mikrosom hati terdapat enzim yang berperan dalam reaksi biotransformasi fase satu dan kedua dari senyawa nitroso. Tujuan dari biotransformasi ini adalah untuk meningkatkan kelarutan dalam air, sehingga dapat diekskresikan. Pada biotransformasi fase satu dari nitrosamin, reaksi utama yang terjadi adalah reaksi hidrosilasi dan dealkilasi. Pada fase kedua, produk dari fase satu ditransformasikan menjadi metabolit polar dengan adanya enzim spesifik yang mengkonjugasinya dengan asam glukoronik atau asam sulfurik atau asam amino atau glutation. Enzim untuk fase satu dan kedua dari proses biotransformasi terdapat tidak hanya di hati, tetapi juga terdapat di usus, ginjal, paru-paru, otak, kulit, dan plasenta (1). Nitrosamin diekskresikan sebagian di urin dan melalui pernapasan (1). Sisa nitrosamin didegradasi menjadi karbondioksida melalui intermediet aktif. Intermediet aktif ini ternyata juga mempunyai aktivitas karsinogenik.

Pada beberapa penelitian yang telah dilakukan, ditemukan bahwa nitrosamin mempunyai sifat karsinogenik. Sebanyak 130 macam senyawa N-nitroso telah diuji, dan 80% merupakan zat karsinogenik (7). Potensi karsinogenik nitrosamin sangat bervariasi. NDMA dan NDEA merupakan karsinogen kuat, sedangkan nitrosodietanolamin dan nitrososarkosin

merupakan karsinogen lemah. Senyawa nitrosamin tertentu dapat menimbulkan keganasan hanya setelah satu dosis, bahkan ada yang dapat menembus plasenta dan menimbulkan keganasan pada janin (7).

N-Nitrosodimetilamin (NDMA)

N-Nitrosodimetilamin (NDMA) merupakan senyawa dialkilnitrosamin paling sederhana, berbentuk cair/minyak berwarna kuning, bersifat mudah menguap, mudah terbakar dan mudah terurai bila terkena cahaya, terutama sinar UV. NDMA mempunyai rumus molekul $C_2H_6N_2O$ dan berat molekul 74,08 (10). Sedangkan rumus struktur NDMA adalah sebagai berikut:

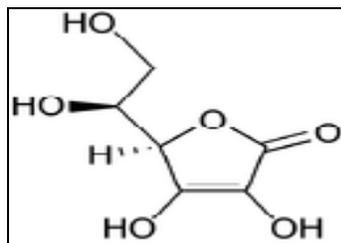


Gambar 3. Rumus struktur N-Nitrosodimetilamin (NDMA)

NDMA merupakan senyawa nitrosamin yang diketahui bersifat karsinogenik kuat (7). Menurut Lu, nitrosamin tertentu misalnya NDMA dan NDEA, dalam jumlah sedikit dan dengan dosis rendah, telah dapat menimbulkan keganasan pada hewan percobaan (3). Menurut Wiesburger, NDMA menimbulkan keganasan hati, ginjal, dan paru-paru pada hewan percobaan rodensia. Dan menurut Sen (1974), dikutip dari Fardias, 50 ppm NDMA di dalam diet menimbulkan keganasan hati dalam waktu 24-40 minggu, sedangkan dosis 200 ppm menimbulkan keganasan ginjal (3).

B. VITAMIN C

Vitamin C termasuk vitamin yang larut air, berbentuk serbuk atau hablur, putih atau agak kuning, tidak berbau, bersifat asam, dan mempunyai rasa asam. Rumus empirik vitamin C adalah $C_6H_8O_6$ dengan berat molekul 176,13 (11). Sedangkan rumus struktur dari vitamin C adalah sebagai berikut:



Gambar 4. Rumus struktur vitamin C

Vitamin C mudah larut air (1 g di dalam 3 ml air), agak sukar larut dalam alkohol dan gliserol, dan praktis tidak larut dalam zat pelarut organik nonpolar seperti eter, benzen, kloroform dan lain-lain (11). Di dalam larutan, vitamin C mudah rusak oleh pemanasan, sinar, oksidasi, dan kebasaan. Vitamin C dalam bentuk kristal kering lebih stabil. Di dalam larutan yang bersifat asam, relatif lebih stabil daripada di dalam larutan netral atau basa (12). Vitamin C juga mudah rusak pada penyimpanan dan pemasakan serta berbagai proses teknologi pangan.

Asam askorbat mudah dioksidasi menjadi dehidro asam askorbat. Perubahan asam askorbat menjadi dehidro asam askorbat merupakan suatu reaksi reversibel, dan kedua zat tersebut membentuk suatu sistem reduksi-oksidasi (13). Baik asam askorbat maupun dehidro asam askorbat

mempunyai aktivitas biologis tinggi. Isomer L asam askorbat mempunyai aktivitas biologis dan terdapat di alam, sedangkan isomer D yang disebut asam eritorbat tidak mempunyai aktivitas biologis atau antiskorbut, tetapi dapat digunakan sebagai antioksidan dalam makanan (12).

Sifat kimiawi yang menonjol dari vitamin C adalah sebagai antioksidan. Selain itu banyak fungsi-fungsi fisiologis memerlukan peran vitamin C, misalnya integritas epitel, termasuk epitel pembuluh darah, pertumbuhan tulang dan gigi. Vitamin C berperan pada berbagai proses metabolisme di dalam tubuh, misalnya oksidasi asam amino tirosin dan fenilalanin, hidroksilasi prolin dan lisin pada pembentukan kolagen, sintesis karnitin, hidroksilasi sebagai tahap konversi kolesterol menjadi asam empedu di mikrosom sel hati. Vitamin C juga berperan dalam berbagai proses biokimia di dalam tubuh lainnya seperti sintesis nor-adrenalin, sintesis steroid anti-perdarahan, absorpsi besi, dan sistem imun tubuh. Pada tingkat molekuler, vitamin C berperan pada reaksi redoks (14). Granulosit polimorfonuklear (PMN) mengandung vitamin C 10-40 kali lebih tinggi daripada konsentrasi di dalam plasma, sedangkan granulosit ini adalah pertahanan pertama terhadap infeksi bakteri dan virus. Hal ini menunjukkan peran vitamin C dalam imunitas tubuh yaitu meningkatkan aktivitas anti-bakteri fagosit tersebut (3). Dalam bidang pengobatan, vitamin C meningkatkan ekskresi obat-obatan seperti salisilat, atropin, amonium klorida, tetrasiklin, dan barbiturat (15).

Cadangan vitamin C di dalam tubuh adalah 1500 mg. Kira-kira 40-60 mg atau 3-4% cadangan dipakai setiap hari. Jika cadangan tubuh jenuh,

maka kelebihan vitamin C yang diserap akan dimetabolisir dan diekskresi melalui urin. Ambang ginjal untuk vitamin C 1,5 mg/dL. Dalam keadaan ini konsentrasi asam askorbat serum 1,5 mg/dL (16). Status vitamin C dinilai dalam serum (plasma), leukosit, darah total atau urin. Status nutrisi vitamin ini didasarkan pada penentuan konsentrasinya dalam serum atau plasma, sedangkan konsentrasi dalam leukosit lebih menunjukkan cadangan tubuh. Asam askorbat diukur dengan kromatografi yaitu kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan detektor elektrokimiawi (3).

Konsentrasi vitamin C plasma lebih dari 0,4 mg/dL atau 22,71 $\mu\text{mol/L}$ cukup untuk mencegah keganasan. Konsentrasi ini bisa dicapai dengan masukan 60 mg vitamin C per hari. Untuk kesehatan yang optimal, konsentrasi vitamin C plasma minimum 1,0 mg/dL atau 56,78 $\mu\text{mol/L}$. Konsentrasi ini bisa dicapai dengan masukan 150 mg vitamin C per hari (3). Dosis vitamin C untuk manusia adalah 25-40 mg per hari menurut 'recommended dietary allowance' (RDA 1988).

Menurut penelitian pada manusia dan hewan, pemberian vitamin C dosis rendah sampai tinggi tidak memberikan akibat negatif. Pemberian megadosis vitamin C sebesar 1000 mg per hari selama 3 bulan tidak memberikan gejala-gejala toksisitas pada manusia. Bila diperlukan, megadosis vitamin C dapat diberikan untuk memperoleh daya tahan tubuh tinggi, pertumbuhan, berbagai penyakit seperti kanker, aterosklerosis, stress, dan adiksi obat (14). Sumber vitamin C yang penting di dalam makanan adalah sayur-sayuran dan buah-buahan segar.

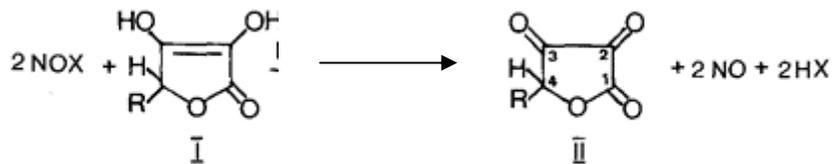
Vitamin C dapat diabsorpsi dengan mudah dan hampir sempurna (80-90%), selanjutnya melalui vena porta menuju hati. Absorpsi dapat dihambat oleh keadaan aklorhidria. Setelah diabsorpsi, vitamin C didistribusikan ke seluruh tubuh. Distribusi vitamin C tertinggi di adrenal, pankreas, lien, glandula salivarius, dan testes. Kemudian distribusi menurun di dalam jaringan otak dan mata.

Nitrosasi adalah interaksi antara *nitrogenous compound* (senyawa amin) dengan *nirosating intermediate* (nitrogen trioksida) atau *nitrosating agent* (asam nitrit). Unsur yang dapat bereaksi secara cepat dengan *nitrosating intermediate* atau *nitrosating agent* dan mengubahnya menjadi bentuk *non-nitrosating* dapat menghambat nitrosasi. Unsur-unsur yang secara fisiologis penting untuk ini antara lain adalah vitamin C. Vitamin ini digunakan untuk menghambat reaksi nitrosasi di dalam makanan (*in vitro*) dan *in vivo* (2, 6). Asam askorbat bekerja lebih efisien pada pH 3-5, namun bereaksi dengan nitrit 230 kali lebih lambat daripada anion askorbat (7). Pada manusia penghambatan secara sempurna terjadi dengan pemberian 1 gram vitamin C dosis tunggal bersama-sama dengan pemberian 325 mg nitrat dan 250 mg prolin. Menurut peneliti lain, 500 mg vitamin C diberikan 4 hari berturut-turut dapat menghambat 85% reaksi nitrosasi *in vivo*.

Publikasi penelitian akhir-akhir ini menyatakan bahwa vitamin C 3 x 100 mg per hari setelah makan dapat mencegah nitrosasi endogen (6, 17). Dalam suatu penelitian longitudinal (Cohort), didapatkan bahwa masukan vitamin C lebih atau sama dengan 70 mg per hari dapat mencegah kanker

paru-paru dan lambung, juga dalam penelitian retrospektif (kasus-kontrol) ditemukan bahwa konsumsi vitamin C berasosiasi dengan rendahnya risiko keganasan tertentu, terutama keganasan lambung dan esofagus (3). Salah satu penelitian dilakukan untuk membuktikan bahwa vitamin C menghambat nitrosasi *in vivo*, yaitu tes nitrosoprolin (6, 18). Pada penelitian ini disimpulkan bahwa vitamin C mempunyai potensi menghambat nitrosasi.

Reaksi nitrosasi untuk membentuk NDMA berlangsung antara dimetilamin dengan nitrogen trioksida (N_2O_3) yang berasal dari asam nitrit. Dengan adanya asam askorbat, maka asam nitrit akan bereaksi dengan asam askorbat, sehingga terbentuk dehidro asam askorbat, nitrogen oksida (NO) dan air. Nitrogen oksida adalah bentuk *non-nitrosating*. Dengan demikian reaksi nitrosasi dapat dihambat.



Gambar 5. Mekanisme penghambatan nitrosasi oleh vitamin C

Namun dengan adanya oksigen, nitrogen oksida tersebut akan diubah menjadi nitrogen trioksida dan nitrogen tetraoksida yang merupakan *nitrosating species* yang kuat sehingga terkadang dilaporkan bahwa asam askorbat mengkatalisis reaksi nitrosasi. (6, 18). Hal ini dapat diatasi dengan pemberian vitamin C dengan rasio lebih besar daripada kadar nitrit yang ada.

Dengan rasio antara vitamin C dan nitrit sebesar 2 : 1 dapat menghambat nitrosasi dimetilamin dan piperazin *in vitro* (6).

Efisiensi vitamin C dalam menghambat reaksi nitrosasi tergantung pada kecepatan relatif reaksi antara vitamin C dengan *nitrosating intermediate* dan reaksi antara *nitrogenous compound* dengan *nitrosating intermediate*. Kecepatan reaksi antara nitrogen trioksida dengan vitamin C adalah 2-4 kali reaksi antara nitrogen oksida dengan senyawa amin (14, 16).

Keadaan-keadaan yang menurunkan potensi vitamin C dalam menghambat reaksi nitrosasi (6) adalah :

- Reaksi nitrosasi pada fase non-akua (misalnya fase lipid), karena di sini kelarutan vitamin C rendah. Hal ini dapat diatasi dengan penggunaan derivat vitamin C yang larut dalam pelarut organik seperti ester palmitat asam askorbat,
- Tiosianat dan halida dapat bereaksi dengan HNO_2 (untuk membentuk *nitrosating intermediate*) dengan kecepatan sama atau lebih cepat daripada vitamin C pada konsentrasi sama,
- Terbentuk spesi elektrofilik atau *free radical nitrosating species* selama reaksi nitrosasi, selanjutnya berinteraksi dengan vitamin, sehingga vitamin C relatif tidak efektif.

C. METODE ANALISIS SENYAWA N-NITROSODIMETILAMIN

1. Metode Kromatografi Gas (*Gas Chromatograph*)

- a. Kromatografi gas Packard Model 439 yang dilengkapi detektor ionisasi nyala, menggunakan kolom gelas yang dilapisi %10 Carbowax 20M + %2 KOH dalam Chrom WAW[®] 80-100 mesh. Suhu kolom, injektor, dan detektor yang digunakan berturut-turut 100°C, 150°C, dan 150°C. Gas pembawa yang digunakan adalah hidrogen. Volume yang disuntikkan sebanyak 2 µL (19).
- b. Kromatografi gas Shimadzu 14A yang dilengkapi detektor fotometrik nyala. Kolom yang digunakan adalah kolom kapiler kombinasi antara silika dengan DB-1701, dengan panjang 15 m dan diameter dalam 0,53 mm. Suhu awal kolom 100°C kemudian diatur dengan program kenaikan suhu 10°C/menit hingga mencapai suhu 260°C. Suhu injektor dan detektor sebesar 280°C. Gas pembawa yang digunakan adalah nitrogen, dengan laju alir 10 mL/menit (20).
- c. Kromatografi gas Hewlett Packard 6980 Plus GC / 5973 MSD yang dilengkapi dengan *mass selective detector*. Kolom yang digunakan yaitu HP-210 GC column 50%-trifluoropropyl-50%-methylsiloxane dengan panjang 30 m, diameter dalam 0,25 mm. Suhu awal kolom adalah 45°C dipertahankan selama 3 menit kemudian diatur dengan program kenaikan suhu 50°C/menit hingga mencapai suhu 180°C dan dipertahankan selama 0,5 menit. Gas pembawa yang digunakan

adalah helium dengan kecepatan alir 2,0 mL/menit. Menggunakan *syringe* 100 μL yang terintegrasi dalam *autosampler*, dengan volume injeksi adalah 50 μL (21).

- d. Kromatografi gas Varian Star 3400CX yang dilengkapi *mass selective detector*. Kolom yang digunakan adalah kolom Restek Rtx-5MS sepanjang 30 m dan diameter dalam 0,25 mm. Suhu injektor adalah 190°C. Volume yang disuntikkan adalah 5 μL (22).
- e. Kromatografi gas Hewlett Packard 5890 seri II yang dilengkapi *mass selective detector*. Kolom yang digunakan adalah kolom silika SGE BPX5 dengan panjang 25 m dan diameter dalam 0,32 mm. Suhu awal kolom adalah 50°C yang dipertahankan selama 5 menit, lalu diatur dengan program kenaikan suhu 10°C/menit hingga mencapai suhu 200°C yang dipertahankan selama 2 menit, kemudian diatur lagi dengan program kenaikan suhu 30°C/menit hingga suhu mencapai 300°C. Helium digunakan sebagai gas pembawa dengan laju alir sebesar 1 mL/menit. Pelarut yang digunakan adalah diklormetan dengan volume penyuntikan sebesar 1 μL (23).

2. Metode *Liquid Chromatograph* (LC)

- a. Menggunakan *Agilent 1100 capillary liquid chromatograph* yang dipasangkan langsung dengan *spectrometer massa* API 4000 Qtrap. Kolom yang digunakan adalah kolom kapiler Phenomenex dengan panjang 15 cm dan diameter dalam 0,32 mm. Fase gerak merupakan

campuran antara solven A (10 mM amonium asetat dan 0,01% asam asetat dalam air) dan solven B (100% metanol). Menerapkan program gradien solven yang terdiri dari 60% solven B selama 1 menit, kemudian meningkat dengan solve B dari 60% hingga 90% selama 5 menit, lalu kembali lagi dengan 60% solven B selama 0,1 menit. Laju alir yang digunakan adalah 6 $\mu\text{L}/\text{menit}$ dan volume injeksi sebesar 1,2 μL (24).

C. KROMATOGRAFI GAS

1. Teori (25)

Kromatografi gas adalah suatu cara untuk memisahkan senyawa atsiri dengan meneruskan arus gas melalui fase diam. Bila fase diam berupa zat padat, maka cara itu disebut sebagai kromatografi gas-padat (KGP). Ini didasarkan pada sifat penyerapan kemasan kolom untuk memisahkan cuplikan, terutama cuplikan gas. Kemasan kolom yang biasa dipakai adalah silika gel, ayakan molekul, dan arang.

Bila fase diam berupa zat cair, cara tadi disebut kromatografi gas-cair (KGC). Fase cair disapukan berupa lapisan tipis pada zat padat yang lembam dan pemisahan didasarkan pada partisi cuplikan yang masuk ke dan keluar dari lapisan zat cair ini. Banyaknya macam fase cair yang dapat digunakan sampai suhu 400°C mengakibatkan KGC merupakan bentuk kromatografi

gas yang paling serba guna dan selektif. KGC digunakan untuk menganalisis gas, zat cair, dan zat padat.

Kromatografi pertama kali digunakan oleh Ramsey pada tahun 1905 untuk memisahkan campuran gas dan campuran uap. Sejumlah percobaan pertama ini menggunakan penyerapan selektif oleh penyerap padat seperti arang aktif. Tahun berikutnya, Tswett memperoleh sejumlah pita berwarna yang terpisah-pisah pada kolom kromatografi.

Pada KGC, komponen yang akan dipisahkan dibawa oleh gas lembam (gas pembawa) melalui kolom. Campuran cuplikan terbagi diantara gas pembawa dan pelarut (fase diam) yang terdapat pada zat padat dengan ukuran partikel tertentu (penyangga padat). Pelarut akan menahan komponen secara selektif berdasarkan koefisien distribusinya sehingga terbentuk sejumlah pita yang berlainan pada gas pembawa. Pita komponen ini meninggalkan kolom bersama aliran gas pembawa dan dicatat sebagai fungsi waktu oleh detektor.

Keuntungan dari kromatografi gas yaitu :

1. Kecepatan

Seluruh analisis dapat diselesaikan dalam waktu singkat. Penggunaan gas sebagai fase gerak mempunyai keuntungan, yaitu tercapainya kesetimbangan antara fase gerak dan fase diam, dan dapat digunakan kecepatan-gas-pembawa yang tinggi.

2. Resolusi (daya pisah)

Misalnya puncak C_{18} , $C_{18:1}$, dan $C_{18:2}$ yang menyatakan ester metil asam stearat, oleat, dan linoleat. Pemisahan ketiga senyawa ini dengan cara lain sangat sukar atau tidak mungkin, perbedaan titik didihnya kecil sekali, hanya dalam derajat ketidakjenuhan. Tetapi dengan menggunakan fase cair yang selektif, KGC dapat memisahkan ketiganya; suatu hal yang tidak mungkin dilakukan dengan cara penyulingan atau cara lain.

3. Analisis kualitatif

Waktu retensi adalah waktu sejak penyuntikan sampai maksimum puncak. Sifat ini merupakan ciri khas cuplikan dan fase cair pada suhu tertentu. Dengan menggunakan aliran yang tepat dan mengendalikan suhu, waktu retensi dapat terulang dalam batas 1% dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi tiap puncak. Beberapa senyawa mungkin mempunyai waktu retensi yang sama atau berdekatan, tetapi tiap senyawa hanya mempunyai satu waktu retensi saja. Waktu retensi ini tidak terpengaruh oleh adanya komponen lain.

4. Analisis kuantitatif

Luas tiap puncak yang terbentuk berbanding lurus dengan konsentrasi puncak tersebut. Ini dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi yang tepat dari setiap komponen. Ketelitian yang dapat dicapai oleh KGC bergantung pada cara, detektor, metode integrasi, dan konsentrasi cuplikan.

5. Kepekaan

Alasan utama mengapa penggunaan kromatografi gas pada analisis begitu meluas adalah karena kepekaannya. Bentuk sel penghantar panas

yang paling sederhana dapat mendeteksi sampai 0,01% (100 bpj = bagian per juta). Detektor pengionan nyala dapat mendeteksi dengan mudah bagian per juta, detektor tangkap elektron dan detektor fosfor dapat mengukur pada skala pikogram (10^{-12} g). Keuntungan tambahan dari kepekaan yang tinggi ini adalah cuplikan yang diperlukan sedikit sekali. Beberapa mikroliter saja sudah cukup untuk analisis lengkap.

6. Kesederhanaan

Kromatografi gas mudah dijalankan dan mudah dipahami. Penafsiran data yang diperoleh biasanya cepat dan langsung, serta mudah. Bila dibandingkan dengan data yang diperoleh, harga instrumentasi ini termasuk murah.

2. Instrumentasi

Bagian-bagian utama dari sebuah kromatografi gas yaitu silinder dengan gas pembawa (*carrier gas*), pengukur tekanan dan pengontrol *flow rate*, tempat injeksi sampel (*injection port*), kolom, detektor dan amplifier, rekorder/perekam, oven dengan termostat untuk tempat injeksi (gerbang suntik), kolom, dan detektor (26).

3. Sistem Kromatografi

a. Gas Pembawa (25).

Tangki gas bertekanan tinggi berlaku sebagai sumber gas pembawa. Suatu pengatur tekanan digunakan untuk menjamin

tekanan yang seragam pada pemasok kolom sehingga diperoleh laju aliran gas yang tetap. Gas yang biasa dipakai adalah hidrogen, helium, dan nitrogen. Gas pembawa harus memiliki sifat: inert, untuk mencegah interaksi dengan cuplikan atau pelarut (fase diam), dapat meminimumkan difusi gas, mudah didapat dan murni, murah serta cocok untuk detektor yang digunakan.

b. Pemasukan Cuplikan (25)

Cuplikan harus dimasukkan ke dalam kolom sekaligus. Pemeriksaan cara memasukkan cuplikan yang baik adalah dengan menaikkan suhu pemanas tempat suntik dan memperkecil ukuran cuplikan. Bila salah satu dari kedua faktor ini memperbesar jumlah pelat teori, artinya cara mencuplik tidak baik. Cuplikan gas biasanya dimasukkan dengan semprit kedap-gas.

Zat cair ditangani dengan semprit. Baru-baru ini alat untuk menyuntikkan zat padat langsung sudah tersedia. Tetapi cara yang paling mudah untuk zat padat adalah dengan melarutkannya dalam suatu pelarut yang tidak mengganggu cuplikan yang dianalisis. Suatu cara baku untuk memasukkan gas dan zat cair adalah dengan memasukkan jarum suntik melalui septum yang dapat menutup kembali sendiri dan menyuntikkan sejumlah volume terukur dari semprit.

c. Kolom

Pipa kolom dapat terbuat dari tembaga, baja nirkarat, aluminium, dan kaca yang berbentuk lurus, lengkung, atau melingkar. Tembaga kurang cocok karena dapat menyerap atau bereaksi dengan komponen cuplikan tertentu (amin, asetilena, terpen, dan steroid). Pada umumnya digunakan baja nirkarat, yang dikemas dalam bentuk lurus agar kemasan seragam, kemudian dilingkarkan agar dapat dipasang dalam ruang kolom yang terbatas. Kolom lurus lebih efisien, tetapi dapat menjadi tidak praktis, terutama bila alat bekerja pada suhu tinggi (25).

Kolom pada kromatografi gas dikelompokkan menjadi dua kelompok utama, yaitu kolom yang terkemas (*packed column*) dan kolom kapiler (*capillary column*) atau kolom tabung terbuka.

- 1). Kolom yang terkemas (*packed column*) mempunyai panjang antara 1-10 meter dengan diameter dalam antara 3-10 mm atau sampai lebih dari 10 cm bagi kolom preparatif. Kolom diisi dengan suatu material pendukung padat inert yang dilapisi dengan suatu fase diam cair atau padat (26). Kolom ini mudah dibuat, tidak begitu mahal, lebih awet, mempunyai kapasitas yang tinggi dan memadai untuk hampir segala macam pemisahan yang sangat sulit (27).
- 2). Kolom kapiler (*capillary column*) atau kolom tabung terbuka panjangnya dapat mencapai 10-50 meter dengan diameter dalam

sangat kecil, yaitu 0,2-1,2 mm. Berdasarkan cara fase diam dilekatkan pada kolom, maka dibagi menjadi dua yakni:

- i. Kolom WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) dimana fase diam cairan dilapiskan secara langsung pada dinding dalam tabung kapiler.
- ii. Kolom SCOT (*Support Coated Open Tubular Column*) dimana fase diam cairan dilapiskan pada bahan penunjang (*support*) (28). Efisiensi kolom SCOT lebih rendah daripada kolom WCOT tetapi lebih besar daripada *packed column* (29).

d. Fase Diam (25)

Pemilihan fase diam yang tepat mungkin merupakan parameter terpenting pada KGC. Secara ideal fase diam tersebut harus mempunyai ciri sebagai berikut :

- cuplikan harus menunjukkan koefisien distribusi yang berbeda,
- cuplikan harus mempunyai kelarutan yang berarti dalam fase diam,
- fase diam harus mempunyai tekanan uap yang dapat diabaikan pada suhu kerja.

e. Suhu (25)

Dalam sistem kromatografi diperlukan sekali untuk memiliki tiga pengendali suhu yang berlainan.

- Suhu Gerbang Suntik

Gerbang suntik harus cukup panas untuk menguapkan cuplikan sedemikian cepat sehingga tidak menghilangkan keefisienan yang

disebabkan oleh cara penyuntikan. Sebaliknya, suhu gerbang suntik harus cukup rendah untuk mencegah peruraian akibat panas.

- Suhu Kolom

Suhu kolom harus cukup tinggi sehingga analisis dapat diselesaikan dalam waktu yang layak, dan harus cukup rendah sehingga pemisahan yang dikehendaki tercapai. Menurut pendekatan sederhana yang dilakukan oleh Giddings, waktu retensi naik dua kali lipat tiap penurunan suhu kolom 30°C . Untuk kebanyakan cuplikan, semakin rendah suhu kolom, semakin tinggi koefisien partisi dalam fase diam sehingga hasil pemisahan semakin baik. Pada beberapa kasus tidak dapat digunakan suhu rendah, terutama bila cuplikan terdiri atas senyawa yang rentangan titik didihnya lebar. Untuk itu suhu perlu diprogram.

- Suhu Detektor

Pengaruh suhu pada detektor sangat bergantung pada jenis detektor yang digunakan. Tetapi, sebagai patokan umum dapat dikatakan bahwa detektor dan sambungan antara kolom dan detektor harus cukup panas sehingga cuplikan dan/atau fase diam tidak mengembun. Pelebaran puncak dan menghilangnya puncak komponen merupakan ciri khas terjadinya pengembunan.

7. Detektor (26)

Dalam kromatografi gas dikenal beberapa macam detektor yang lazim digunakan dan setiap detektor mempunyai karakteristik dalam

selektivitas, linearitas, sensitivitas atau kemampuan mendeteksi pada jumlah terkecil (*limit detection*).

- a. Detektor daya hantar panas (*Thermal Conductivity Detector/TCD*), mempunyai sifat non destruktif, tidak selektif (bersifat umum), batas linearitas 10^4 dan jumlah terkecil yang masih dapat terdeteksi sampai 10^{-5} g/ml.
- b. Detektor ionisasi nyala (*Flame Ionization Detector/FID*), mempunyai sifat destrukti, dapat mendeteksi semua senyawa organik, batas linearitas 10^7 dan batas terkecil pendeteksian 2×10^{-11} g/ml.
- c. Detektor fotometrik nyala (*Flame Photometric Detector/FPD*), bersifat destruktif, selektif terhadap senyawa sulfur dan fosfor organik, batas linearitas 10^3 dan batas terkecil pendeteksian 2×10^{-12} g/ml.
- d. Detektor termionik nyala (*Flame Thermal Detector/FTD*), bersifat destruktif, selektif terhadap senyawa nitrogen dan fosfor organik, batas linearitas 10^3 dan batas terkecil pendeteksian 2×10^{-10} g/ml.
- e. Detektor penangkap elektron (*Electrolytic Conductivity Detector/ECD*), bersifat destruktif, selektif terhadap senyawa dengan sifat elektronegatif seperti halogen organik, batas linearitas 5×10^2 dan batas terkecil pendeteksian 2×10^{-13} g/ml.

- f. *Thermal Energy Analyser (TEA) Detector* bersifat sangat selektif dengan limit deteksi yang kecil untuk senyawa N-nitroso. Detektor TEA bergantung pada ketidakstabilan relatif ikatan kimia dari senyawa N-nitroso. Dengan detektor TEA, nitrosamin biasanya dapat dideteksi pada skala nanogram. Batas deteksi terkecil dari detektor ini sekitar 100 pg (*picogram*) (30).
8. Rekorder/Perekam (26)

Pada kebanyakan peralatan kromatografi yang telah menggunakan teknologi maju, peran pengolahan data dilakukan oleh suatu alat pengolah data atau komputer. Informasi yang diperoleh dapat dimanfaatkan dalam analisis kualitatif biasanya dilakukan dengan membandingkan waktu retensi contoh zat baku pada kondisi analisis yang sama. Sedangkan untuk analisis kuantitatif biasanya dilakukan dengan perhitungan relatif dari tinggi atau luas puncak kromatogram contoh terhadap zat baku melalui metode baku luar atau baku dalam.

D. 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.

- a. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (*placebo*) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel *placebo* (eksipten obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu, kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi (31).

Penentuan akurasi menggunakan minimal tiga rentang yaitu rendah (*low*), sedang (*medium*), dan tinggi (*high*). Untuk matriks biologis, nilai rata-rata yang diperoleh tidak boleh menyimpang lebih dari +15% dan -15%, kecuali nilai pada LLOQ, dimana nilai rata-rata yang diperoleh tidak boleh menyimpang lebih dari +20% dan -20%. Persen perolehan kembali

analit tidak harus 100%, tetapi tingkat perolehan kembali analit harus konsisten, presisi dan dapat dihasilkan kembali (*reproducible*) (32).

b. 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 (*repeatability*) adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi yang sama dan dalam interval waktu yang pendek. Ketertiruan (*reproducibility*) adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (31).

Presisi harus dilakukan menggunakan lima pengukuran untuk setiap rentang kadar (rendah, sedang, dan tinggi). Untuk matrik biologis, presisi yang ditentukan pada setiap kadar harus memiliki nilai koefisien variasi (KV) tidak lebih dari 15% kecuali untuk LLOQ, dimana nilai KV tidak boleh lebih dari 20%. Pengukuran presisi dapat disubdivisikan menjadi pengukuran presisi atau keterulangan *intra-batch*, yang mengukur presisi

dalam satu proses analisis sekali jalan, dan *inter-batch*, yang mengukur presisi terhadap waktu, dan dapat melibatkan analisis, peralatan, reagen, dan laboratorium yang berbeda (32).

c. Selektivitas (spesifisitas)

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 (31).

d. Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metoda 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.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah

garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (31).

e. Batas deteksi dan batas kuantitasi

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 (31).

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Kuantitatif dan Laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA UI pada bulan Februari sampai dengan Juni 2009.

A. BAHAN

1. Hewan Uji

Mencit jantan dari galur DDY, berumur kurang lebih 3-4 bulan dengan berat badan 30 – 35 gram, berjumlah 25 ekor. Mencit diperoleh dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Jawa Barat.

2. Bahan Uji

Natrium nitrit p.a (Riedel-de Haën); Dimetilamin (Merck); Asam Askorbat (Kalbe Farma)

3. Bahan Kimia

Standar N-Nitrosodimetilamin (Wako Pure Chemicals); Diklormetan p.a (Merck); Heparin; Gas Helium UHP; Gas Hidrogen HP; Gas Nitrogen HP.

B. ALAT

Kromatografi Gas Shimadzu 17A yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala (FID), kolom kapiler dengan panjang 50 meter dan diameter dalam 0,32 mm, dengan fase diam CBP-10; *data processor Class GC Solution*; *microsyringe* 10 μ l (Hamilton); alat sentrifugasi; vortex; sonde 1 mL; *microtube*; lemari pendingin; timbangan analitik; alat-alat gelas yang umum digunakan dalam analisis kuantitatif.

C. CARA KERJA

1. Pembuatan larutan induk N-Nitrosodimetilamin 1000 μ g/ml

Standar N-Nitrosodimetilamin ditimbang secara seksama sebanyak 25 dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan diklormetan sampai tanda batas sehingga didapatkan larutan induk 1000 ppm. Pengenceran larutan induk dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah. Larutan induk disimpan pada suhu 4°C.

2. Pencarian Kondisi Analisis Optimum N-Nitrosodimetilamin

Parameter yang diubah pada pencarian kondisi analisis optimum adalah suhu kolom dan kecepatan alir gas pembawa (Helium). Pertama-tama elusi dilakukan dengan variasi kecepatan alir gas pembawa yaitu 0,50 dan 1,00 ml/menit pada suhu kolom 130°C. Kemudian dilakukan variasi suhu

kolom yaitu pada suhu 130°C, 150°C dan 170°C. Untuk semua elusi, suhu injektor 200°C dan suhu detektor 220°C dan menggunakan larutan induk 1000 ppm dengan volume injeksi sebesar 5,0 µl.

3. Validasi Metode Analisis N-Nitrosodimetilamin

a. Uji keseksamaan (presisi)

Larutan N-Nitrosodimetilamin dengan konsentrasi berbeda (rendah, sedang, tinggi) yaitu 1,0; 4,0 dan 10,0 µg/ml sebanyak 5,0 µl disuntikkan ke dalam alat KG pada kondisi analisis terpilih. Prosedur pada masing-masing konsentrasi diulang sebanyak lima kali. Dari luas puncak yang diperoleh, dihitung simpangan baku relatif dan koefisien variasinya. Konsentrasi larutan standar N-Nitrosodimetilamin dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi standar

b. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas

Larutan standar NDMA dengan konsentrasi 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; dan 10,0 µg/ml masing-masing sebanyak 5,0 µl disuntikkan ke dalam alat KG pada kondisi analisis terpilih. Luas puncak yang diperoleh dicatat dan diolah secara statistik sehingga diperoleh persamaan regresi dan koefisien korelasinya.

c. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi dan batas kuantitasi NDMA ditentukan dengan metode perhitungan statistik, melalui persamaan regresi linier kurva kalibrasi standar NDMA yang telah dibuat sebelumnya.

d. Uji Perolehan Kembali (UPK)

Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode plasebo. Darah mencit mengandung NDMA dengan konsentrasi 1,0; 4,0; dan 10,0 µg/ml dimana tiap konsentrasi sebanyak 1 ml ditambahkan 2 ml diklormetan, dicampur dengan vortex selama 10 menit, kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Larutan supernatan diambil dan sebanyak 5,0 µl disuntikkan ke dalam alat KG pada kondisi analisis terpilih. Tiap konsentrasi diulang prosedur yang sama sebanyak tiga kali. Luas puncak NDMA dicatat, kemudian dihitung persentase uji perolehan kembali NDMA.

4. Perlakuan terhadap hewan percobaan**a. Orientasi penentuan dosis NaNO₂ dan waktu pembentukan NDMA maksimum pada mencit**

Sejumlah mencit digunakan untuk mencari kadar nitrosamin maksimal dalam mencit. Pertama dilakukan orientasi dosis NaNO₂ (LD₅₀ 220 mg/kg bb) yang akan diberikan pada percobaan, digunakan 2 kelompok mencit masing-masing 3 ekor dengan perlakuan sebagai berikut:

Tabel 1

Perlakuan untuk orientasi dosis NaNO_2

Perlakuan	Kel. 1	Kel. 2
Larutan air mengandung 0,5 x 220 mg/kg bb NaNO_2 dan Dimetilamin	√	
Larutan air mengandung 220 mg/kg bb NaNO_2 dan Dimetilamin		√

Darah mencit sebanyak 1 ml diambil 4 jam setelah perlakuan, diekstraksi, kemudian sebanyak 5,0 μl hasil ekstraksi disuntikkan ke dalam alat KG kondisi analisis terpilih.

Setelah diperoleh dosis NaNO_2 yang akan digunakan pada percobaan, dilanjutkan dengan melakukan orientasi waktu untuk menentukan kapan terbentuknya nitrosamin secara maksimum pada mencit. Digunakan 4 kelompok mencit, masing-masing 3 ekor dengan perlakuan sebagai berikut :

Tabel 2

Perlakuan untuk orientasi waktu pembentukan NDMA maksimum

Perlakuan	Kel. 1 (2 jam)	Kel. 2 (4 jam)	Kel. 3 (6 jam)	Kel. 4 (8 jam)
Larutan air mengandung NaNO_2 dan Dimetilamin (dosis terpilih)	√	√	√	√

Darah mencit sebanyak 1 ml diambil selama selang waktu untuk masing-masing kelompok setelah perlakuan, diekstraksi, kemudian sebanyak

5,0 µl hasil ekstraksi disuntikkan ke dalam alat KG kondisi analisis terpilih.

Kadar NDMA yang terbentuk dihitung.

b. Persiapan hewan uji

Sejumlah mencit jantan sebanyak 25 ekor dibagi menjadi 5 kelompok secara rancangan acak lengkap, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit dengan berat badan rata-rata 30 - 35 gram. Sebelum dikelompokkan dan diberikan perlakuan, hewan percobaan diaklimatisasi selama satu minggu dalam kandang Laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA UI agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Hewan uji yang digunakan adalah hewan yang sehat dengan ciri-ciri mata bersinar, bulu tidak berdiri, dan tingkah laku normal (aktif). Hewan yang sakit tidak diikutsertakan dalam percobaan.

c. Pemberian perlakuan

Satu minggu setelah aklimatisasi, masing-masing kelompok mendapat perlakuan sebagai berikut secara per oral :

Tabel 3

Pembagian kelompok perlakuan mencit

Perlakuan	Kel. 1	Kel. 2	Kel. 3	Kel. 4	Kel. 5
Larutan air mengandung 0,5 x 220 mg/kg BB NaNO ₂ dan Dimetilamin (kontrol positif)	√	√	√	√	
Vitamin C 1:1 molar dari NaNO ₂		√			
Vitamin C 2:1 molar dari NaNO ₂			√		
Vitamin C 4:1 molar dari NaNO ₂				√	
Larutan mengandung Dimetilamin (kontrol negatif)					√

c. Cara pengambilan darah mencit

Setelah 4 jam perlakuan, mencit terlebih dahulu dianestesi secara inhalasi menggunakan eter. Darah mencit diambil dari sinus orbitalis menggunakan pipet hematokrit. Darah ditampung secara hati-hati ke dalam *microtube* yang telah diberi heparin. Sebanyak 1 mL darah diambil, ditambahkan 2 mL diklormetan, dicampur dengan vortex selama 10 menit, lalu disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil.

5. Analisis Nitrosodimetilamin dalam darah mencit

Supernatan hasil sentrifugasi diambil dan sebanyak 5,0 µl ke dalam KG pada kondisi analisis terpilih. Luas puncak yang diperoleh dicatat dan

kadar NDMA yang terbentuk dapat dihitung menggunakan persamaan kurva kalibrasi NDMA.

6. Analisis Data

Data diolah secara statistik dengan metode uji distribusi normal (Uji *Saphiro-Wilk*), uji homogenitas (uji *Lavene*), dan uji Anava satu arah. Bila data yang dihasilkan berbeda secara bermakna dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pembuatan larutan induk N-Nitrosodimetilamin 1000 µg/ml

Sejumlah standar NDMA ditimbang seksama 26,65 mg, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan diklorometan sampai batas sehingga diperoleh larutan standar NDMA dengan konsentrasi 1066 ppm. Larutan standar ini digunakan untuk pengenceran agar didapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu yang lebih rendah.

2. Pencarian Kondisi Analisis Optimum N-Nitrosodimetilamin

Kondisi analisis optimum untuk penetapan N-Nitrosodimetilamin adalah elusi dengan program suhu kolom sebesar 130°C dan laju alir gas pembawa (He) sebesar 1,00 ml/menit. Kondisi ini dipilih karena paling optimum, yaitu mempunyai harga plat teoritis (N) tertinggi dan HETP terkecil. Waktu retensi NDMA yaitu pada menit ke 5. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.

3. Validasi metode analisis N-Nitrosodimetilamin

a. Uji Presisi NDMA

Larutan standar NDMA dengan konsentrasi berbeda (rendah, sedang, tinggi) yaitu 1,07; 4,26; dan 10,7 ppm digunakan untuk uji presisi. Masing-masing konsentrasi memberikan nilai koefisien variasi berturut-turut 1,24%; 2,15%; dan 3,10%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 7.

b. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas

Kurva kalibrasi dibuat menggunakan larutan standar NDMA dengan konsentrasi 1066 ppm, kemudian diencerkan hingga didapat 6 titik konsentrasi berbeda yaitu 1,07; 2,13; 4,26; 6,39; 8,53; dan 10,7 ppm. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi NDMA adalah $y = 796,572 + 5295,9964x$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9996. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 6 dan Tabel 5.

c. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Berdasarkan perhitungan statistik menggunakan persamaan regresi linier kurva kalibrasi standar NDMA, diperoleh batas deteksi (LOD) sebesar 0,316 ppm dan batas kuantitasi (LOQ) sebesar 1,053 ppm. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6.

d. Uji Perolehan Kembali NDMA

Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode plasebo. Tiga konsentrasi berbeda dari NDMA yaitu 1,004; 4,016 dan 10,04 ppm, masing-masing dalam 1 ml darah kemudian diekstraksi. Persentase perolehan kembali dari masing-masing konsentrasi mulai dari yang terendah adalah $113,39 \pm 5,05\%$; $105,66 \pm 6,86\%$; dan $93,94 \pm 3,0\%$.

4. Perlakuan terhadap hewan percobaan

Berdasarkan hasil orientasi didapatkan pembentukan nitrosamin maksimum dalam darah mencit yaitu pada pemberian NaNO_2 dengan dosis $0,5 \times 220 \text{ mg/kg bb}$ dan dimetilamin sejumlah seperlima bagian dari NaNO_2 , diberikan secara oral, dimana darah diambil 4 jam setelah perlakuan. Kadar rata-rata dari nitrosodimetilamin yang terbentuk pada kelompok kontrol positif adalah 2,325 ppm. Sedangkan pada kelompok kontrol negatif maupun kelompok uji (dengan penambahan pemberian vitamin C dosis berbeda) tidak terdeteksi adanya nitrosodimetilamin yang terbentuk. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9.

B. PEMBAHASAN

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui kadar N-Nitrosodimetilamin (NDMA) yang terbentuk pada mencit setelah pemberian

sejumlah prekursor secara oral serta untuk mengetahui pengaruh penghambatan pembentukan NDMA oleh vitamin C.

Seperti yang telah dipaparkan pada pendahuluan, telah banyak penelitian yang membuktikan bahwa vitamin C mempunyai aktivitas untuk menghambat pembentukan nitrosamin, dengan cara menghambat reaksi nitrosasi. Pada penelitian ini digunakan beberapa tingkatan dosis yang berbeda dari vitamin C untuk mengetahui seberapa besar vitamin C yang cukup untuk menghambat pembentukan NDMA dalam tubuh mencit.

Tahapan kerja yang dilakukan yaitu mencari kondisi analisis optimum untuk penetapan kadar NDMA, lalu melakukan validasi metode analisis untuk penetapan kadar NDMA dari kondisi analisis optimum yang diperoleh. Kemudian setelah memperoleh metode analisis yang telah divalidasi, metode tersebut digunakan untuk memperoleh kadar NDMA dalam sampel darah mencit sebelum dan setelah pemberian vitamin C.

1. Pencarian Kondisi Analisis Optimum N-Nitrosodimetilamin

Larutan yang digunakan untuk pencarian kondisi analisis optimum ini berasal dari larutan induk standar NDMA 1066 ppm. Pada penelitian ini pencarian kondisi optimum analisis NDMA dilakukan dengan metode elusi suhu tetap/isotermal, dengan variasi suhu kolom yaitu 130°C, 150°C dan 170°C dan variasi laju alir gas pembawa yaitu 0,5 ml/menit dan 1 ml/menit. Untuk semua elusi, suhu injektor dan suhu detektor diatur pada suhu 200°C dan 220°C.

Pada percobaan variasi suhu kolom dapat terlihat bahwa semakin tinggi suhu awal kolom semakin cepat waktu retensi NDMA, semakin kecil nilai N dan semakin besar nilai HETP. Pada percobaan variasi laju alir gas pembawa dapat terlihat bahwa semakin tinggi laju alir gas pembawa semakin cepat pula waktu retensi NDMA, semakin kecil nilai N dan semakin besar nilai HETP.

Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa semakin tinggi suhu kolom dan laju alir gas pembawa maka komponen sampel tersebut hanya sebentar berada di dalam fase diam, karena langsung menguap dan terbawa oleh gas pembawa sehingga pemisahan yang terjadi kurang baik.

Dari hasil percobaan dengan menggunakan variasi suhu awal kolom dan laju alir gas pembawa didapatkan bahwa kondisi yang memberikan nilai N paling besar dan nilai HETP paling kecil adalah metode elusi dengan suhu kolom

Dari hasil percobaan dengan menggunakan variasi suhu awal 130°C dan laju alir gas pembawa 1,0 ml/menit. Waktu retensi NDMA yaitu pada menit ke-5. jadi dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum untuk analisis NDMA adalah dengan suhu kolom 130°C dan laju alir gas pembawa 1,0 ml/menit.

2. Validasi Metode Analisis

a. Uji presisi NDMA

Keseksamaan (*precision*) adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual 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). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (KV) $\pm 15\%$.

Pada penelitian yang dilakukan, 3 konsentrasi NDMA yang dibuat untuk uji presisi yaitu 1,07; 4,26 dan 10,7 ppm. Masing-masing konsentrasi memberikan nilai KV berturut-turut 1,24%; 2,15% dan 3,10%. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria seksama.

b. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas

Sebelum melakukan penetapan kadar, metode yang telah ditetapkan perlu divalidasi. Validasi diawali dengan pembuatan kurva kalibrasi yang bertujuan untuk kepentingan analisis secara kuantitatif, yaitu menghitung kadar zat dalam sampel. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan luas puncak yang dihasilkan oleh sedikitnya lima konsentrasi analit yang berbeda. Rentang konsentrasi yang dibuat harus dipertimbangkan dengan matang agar hasil pengukuran luas puncak

sampel dapat berada pada rentang konsentrasi tersebut, sehingga hasil pengukuran yang diperoleh lebih akurat.

Pada penelitian ini, pembuatan kurva kalibrasi NDMA dilakukan dengan menghubungkan 6 titik konsentrasi berbeda yaitu 1,07; 2,13; 4,26 6,39; 8,53 dan 10,7 ppm. Persamaan kurva kalibrasi merupakan hubungan antara sumbu x dan sumbu y. Deretan konsentrasi yang dibuat dinyatakan sebagai nilai pada sumbu x, sedangkan luas puncak yang diperoleh dari hasil pengukuran dinyatakan sebagai sumbu y. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi NDMA yang diperoleh adalah $y = 796,572 + 5295,9964x$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9996. Harga koefisien korelasi (r) yang semakin mendekati 1 menyatakan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram yang dihasilkan.

c. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi (*limit of detection/ LOD*) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon yang signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi (*limit of quantitation/ LOQ*) merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung secara

statistik menggunakan persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang telah diperoleh.

Berdasarkan perhitungan secara statistik menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi standar NDMA, diperoleh batas deteksi NDMA sebesar 0,316 ppm dan batas kuantitasi NDMA sebesar 1,053 ppm. Konsentrasi tersebut berada di bawah konsentrasi terkecil pembuatan kurva kalibrasi.

d. Uji Perolehan Kembali NDMA

Pada penelitian ini dilakukan uji perolehan kembali (UPK) dengan metode plasebo, dimana sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu ditambahkan ke dalam blanko darah. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan.

Pada penentuan UPK ini dibuat 3 konsentrasi NDMA berbeda (rendah, sedang, tinggi) dalam 1 ml blanko darah, yaitu 1,004; 4,016 dan 10,04 ppm. Setiap konsentrasi diekstraksi dengan penambahan 2 ml diklorometan lalu dicampur dengan vortex selama 10 menit dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Pencampuran dengan vortex dimaksudkan untuk memaksimalkan penarikan NDMA oleh diklorometan sehingga ekstraksi lebih sempurna.

Melalui uji perolehan kembali ini didapatkan hasil pada konsentrasi 1,004 ppm besar persentase perolehan kembali adalah $113,39 \pm 5,05\%$,

konsentrasi 4,016 ppm persentase perolehan kembali adalah $105,66 \pm 6,86\%$, dan konsentrasi 10,04 ppm persentase perolehan kembalinya sebesar $93,94 \pm 3,0\%$. Dengan demikian maka hasil UPK NDMA memenuhi kriteria uji perolehan kembali, dimana nilai % *recovery* yang baik berada dalam rentang 80 – 120%.

3. Perlakuan pada hewan uji

Pada penelitian ini, hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan dari galur DDY berusia 3-4 bulan dengan berat badan sekitar 30 – 35 gram. Pemilihan usia 3-4 bulan karena rentang umur tersebut mewakili usia dewasa pada mencit sehingga diharapkan proses absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi sedang berjalan optimal. Pemilihan jenis kelamin jantan dilakukan untuk menghindari pengaruh hormonal yang umumnya terjadi pada mencit betina yang dapat mempengaruhi hasil. Hewan yang diikutsertakan dalam penelitian adalah mencit yang sehat. Mencit yang memperlihatkan tanda-tanda sakit tidak diikutsertakan.

Pengambilan darah hewan uji dapat dilakukan melalui 5 cara, yaitu memotong ujung ekor, dari sinus orbitalis, dekapitasi lalu darah dikumpulkan, dari jantung, dan dari vena jugularis. Pada penelitian ini dipilih pengambilan darah dari sinus orbitalis (Gambar 6) karena jumlah darah yang didapat banyak, lebih mudah, lebih sederhana dan lebih cepat dibandingkan dengan cara-cara lain (33).

Sebelum diberikan perlakuan dengan larutan uji, terlebih dahulu dilakukan orientasi untuk menentukan dosis dari larutan uji yang akan diberikan serta kapan waktu pengambilan darah setelah perlakuan. Penentuan dosis dari NaNO_2 didasarkan pada nilai LD50 dari NaNO_2 yaitu sebesar 220 mg/kg bb mencit. Dari hasil orientasi didapatkan dosis dari NaNO_2 yang diberikan kepada mencit adalah sebesar $0,5 \times 220$ mg/kg bb. Untuk dosis dimetilamin adalah sebesar seperlima dari jumlah NaNO_2 yang diberikan. Sedangkan pengambilan darah mencit dilakukan 4 jam setelah perlakuan, dengan didasarkan bahwa pada waktu tersebut NDMA yang terbentuk dalam darah mencapai maksimum.

Untuk kelompok uji, yaitu kelompok II, III dan IV, selain diberikan sejumlah prekursor (NaNO_2 dan dimetilamin) juga diberikan larutan vitamin C. Jumlah vitamin C yang diberikan pada tiap kelompok berbeda. Perbedaan dosis vitamin C ini dimaksudkan untuk melihat seberapa besar dosis vitamin C yang efektif untuk menghambat pembentukan NDMA pada mencit. Hasil percobaan menunjukkan ternyata mulai dari pemberian dosis vitamin C terkecil yaitu pada perbandingan molar 1:1 dengan NaNO_2 sudah dapat menghambat pembentukan NDMA. Terbukti dengan tidak terdeteksinya NDMA dalam darah mencit pada semua kelompok uji yang diberikan vitamin C berbagai tingkatan dosis. Berdasarkan hasil ini dapat disimpulkan bahwa pemberian vitamin C dapat menghambat terjadinya pembentukan NDMA dalam tubuh mencit. Namun, tidak terdeteksinya NDMA pada kelompok uji juga dapat disebabkan oleh faktor-faktor lain, misalnya karena kurang

sensitifnya metode yang digunakan, ataupun mungkin NDMA yang sudah terbentuk ikut mengendap sewaktu proses pengendapan protein sehingga tidak terdeteksi pada cairan supernatan hasil ekstraksi. Selain itu juga dapat disebabkan karena dosis vitamin C yang diberikan terlalu besar sehingga pembentukan NDMA dalam mencit kemungkinan dihambat total.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Kondisi analisis optimum untuk analisis N-Nitrosodimetilamin (NDMA) dengan menggunakan alat kromatografi gas Shimadzu GC-17A dengan kolom kapiler CBP-10 dan detektor FID adalah dielusi menggunakan program suhu tetap/isothermal dengan suhu kolom 130°C dan laju alir gas pembawa (He) 1,0 mL/menit. Suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 200°C dan 220°C. Waktu retensi NDMA pada kondisi analisis optimum adalah 5,460 menit.
2. Kadar NDMA rata-rata yang terbentuk pada mencit setelah pemberian sejumlah prekursor (0,5 x 220 mg/kg BB NaNO₂ dan dimetilamin) selama rentang waktu 4 jam adalah antara 2,325 ppm.
4. Pemberian vitamin C bersamaan dengan pemberian prekursor (NaNO₂ dan dimetilamin) mulai dari dosis vitamin C terkecil yaitu pada perbandingan molar yang sama dengan NaNO₂ yang diberikan mungkin sudah dapat menghambat pembentukan NDMA pada mencit. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terdeteksinya NDMA pada hewan uji.

B. SARAN

1. Agar dapat menentukan jumlah NDMA yang dapat terbentuk akibat penghambatan oleh vitamin C, perlu dicari metode dengan sensitivitas lebih besar, misalnya dengan penggunaan detektor yang berbeda.
2. Untuk selanjutnya dapat dilakukan penelitian untuk melihat apakah penghambatan pembentukan NDMA oleh vitamin C juga efektif untuk menekan terbentuknya sel kanker akibat adanya NDMA maupun nitrosamin yang lain.

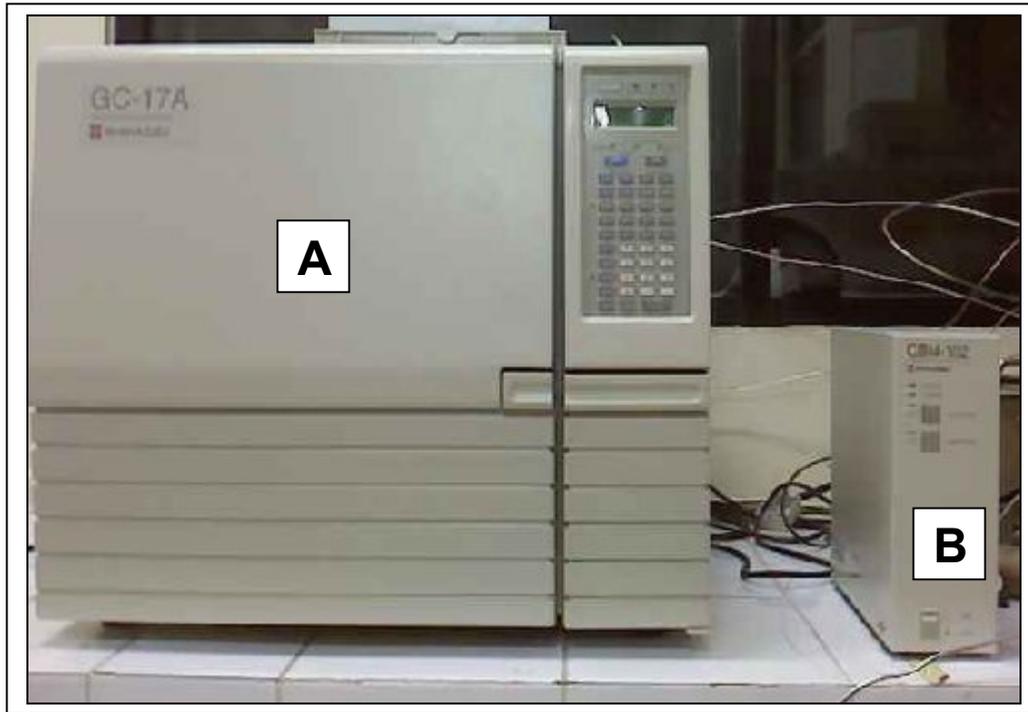
DAFTAR ACUAN

1. Rostkowska, K., Zwierz, K., Rózański, A., Moniuszko-Jakoniuk, J., Roszczenko, A. Formation and Metabolism of N-Nitrosamines. *Polish Journal of Environmental Studies*. 1998. **7**(6): 321-325.
2. Mirvish, S.S. Blocking The Formation of N-nitroso Compounds with Ascorbic Acid *in vitro* and *in vivo*. In: Greendwald P, Eishow AC, Novelli WD, Benton CM eds. *Cancer, diet, and nutrition* 5th ed. Mountain View: Anderson World Book; 1984. 226-230.
3. Handayani, Puspa. *Pengaruh Vitamin C terhadap Perubahan Epitel Nasofaring yang Disebabkan Konsumsi Ikan Asin yang Mengandung Nitrosamin atau Prekursornya*. Tesis Fakultas Pascasarjana Universitas Indonesia Bidang Ilmu Kedokteran Dasar. 1991.
4. Hadiwiyoto, S., Naruki, S. 1985. Peranan Garam Sendawa dalam Pembentukan N-nitrosodimetilamin dan Nitrosopirolidin. *Buletin Biokimia*. 1985. ISSN 0126-1681: 1-12.
5. Shirley, R.L. Nutritional and Phsycological Effects of Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines. *BioScience*. 1975. **25**(12): 789-794.
6. Kyrtopoulos, S.A. Ascorbic Acid and The Formation of N-nitroso Compounds : Possible role of ascorbic acid in cancer prevention. *Am J Clin Nutr*. 1987. **45**: 1344-1350.
7. Muchtadi, D. *Nitrosamin dalam Hubungan dengan Penggunaan Nitrit sebagai Bahan Pengawet Makanan*. Diajukan pada Seminar Bahan Tambahan Kimiawi oleh IPB 3-4 Oktober 1986 di Jakarta.

8. Moller, H., Landt, J., Pedersen, E., Jensen, P., Antrup, H., Jensen, OM. Endogenous Nitrosation in Relation to Nitrate Exposure from Drinking Water and Diet in a Danish Rural Population. *Cancer Res.* 1989. **49**(11): 3117-3121.
9. Boyland, E., Walker, SA. Effect of Thiocyanate on Nitrosation of Amines. *Nature.* 1974. **248**: 601-602.
10. Anonim. *Concise International Chemical Assessment Document 38: N-Nitrosodimethylamine.* Geneva: WHO. 2002.
11. Anonim. *Farmakope Indonesia* edisi ketiga. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. h. 47.
12. Garard, I.D. *Introductory Food Chemistry.* Connecticut: AVI. 1976. 86-105, 289-305.
13. Bellaart, A.C. *Ikhtisar Ringkas Vitamin dan Hormon Terpenting* cetakan 4. (Terjemahan oleh Muliawan M). Jakarta: Djambatan. 1983. 29-32.
14. Soerjodibroto, W.S. Vitamin C Dipandang dari Sudut Gizi. Dalam buku: Tjokronegoro A ed. *Vitamin C dan Penggunaannya Dewasa Ini.* Jakarta: Balai Penerbitan FKUI. 1985.
15. Setio Kartono, T.H. Pro dan Kontra Penggunaan Vitamin C Dosis Mega. Dalam buku: Tjokronegoro A ed. *Vitamin C dan Penggunaannya Dewasa Ini.* Jakarta: Balai Penerbitan FKUI, 1-5.
16. Hodges, R.E. Ascorbic Acid. In: Goodhart RS, Shils ME, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease* 6th ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1980. 259-273.
17. Marks, J. *Vitamin Safety.* Basle: Hoffmann-La Roche. 1983.

18. Tannebaum, S.R., Wishnok, J.S. Inhibition of Nitrosamine Formation by Ascorbic Acid. *Ann NY Acad Sci.* 1987. **489**: 354-363.
19. Aygün, Sekar Fatma., Ahmet Uyanik, Bekir Bati. Adsorption of N-Nitrosodiethylamine and N-Nitrosodimethylamine on Activated Carbon: A Pre-Concentration Procedure for Gas Chromatographic Analysis. *Microchimica Acta.* 2004. **146**: 279-283.
20. Kataoka, H., M. Kurisu, S. Shindoh. Determination of Volatile N-Nitrosamine in Combustion Smoke Samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 1997. **59**: 570-576.
21. Prest, Harry F. and Richard E. Herrmann. *An Approach to The Determination of N-Nitrosodimethylamine at Part-per-quadrillion Levels Using Positive Chemical Ionization and Large-Volume Injection.* USA: Hewlett-Packard Company. 1999.
22. Larabee-Zierath, David. *Detection of N-Nitrosodimethylamine (NDMA) at Low part-per-trillion Levels by C/MS Ion Trap using Chemical Ionization (CI) with Selected Ion Storage.* Iowa City: University of Iowa Hygienic Laboratory. 2001.
23. Dalling, J.W., D.M.F.A Pachen, A.H.P Lousberg, J.A.M van Geel, G.M.P Houben, R.W. Stockbrügger. J.M.S van Maanen, J.C,S Kleinjans. Volatile N-Nitrosamines in Gastric Juice of Patients with Various Conditions of Gastrointestinal Tract Determined by Gas Chromatograph-Mass Spectrometry and Related to Intragastric pH and Nitrate and Nitrite Levels. *Cancer Letters.* 1998. **124**: 119-125.
24. Zhao, Yuan-Yuan, Jessica Boyd, Steve E. Hrudey, Xing-Fang Li. Characterization of New Nitrosamines in Drinking Water using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology.* 2006. **40**: 7636-7641.
25. McNair, H.M. & Bonelli, E.J. *Dasar Kromatografi Gas* terbitan ke-5, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB. 1988. 1-14

26. Harmita. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI. 2006. 185, 201.
27. Anwar, Nur M., Hendra Adijuwana. *Teknik Separasi dalam Analisis Pangan*. Bogor: Pusat Antar Universitas IPB. 1988. 60-62.
28. Johnson, Edward L., R. Stevenson. *Dasar Kromatografi Cair*. Penerjemah: Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB. 16-44, 246-248.
29. Skoog, Douglas A., James J. Leary. *Principles of Instrumental Analysis*. Florida: Saunders College Publishing. 1991. hal 607.
30. Westmoreland, David G & Rhodes, Gerald R. Analytical Techniques for Trace Organic Compound-II, Detector for Gas Chromatography. *Pure & Appl. Chem.* 1989. **61**(6): 1147-1160.
31. Harmita. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia. 2006. 1-32.
32. Guidance for Industry: *Bioanalytical Method Validation*. Center of Drug Evaluation and Research (CDER). <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. 2001. Tanggal 19 November 2006 pukul 20.30.
33. Smith, John B., Soesanto Mangkoewidjojo. *Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Depok: UI Press. 1988. hal 30, 38-39.



Gambar 6. Alat kromatografi gas Shimadzu GC-17A

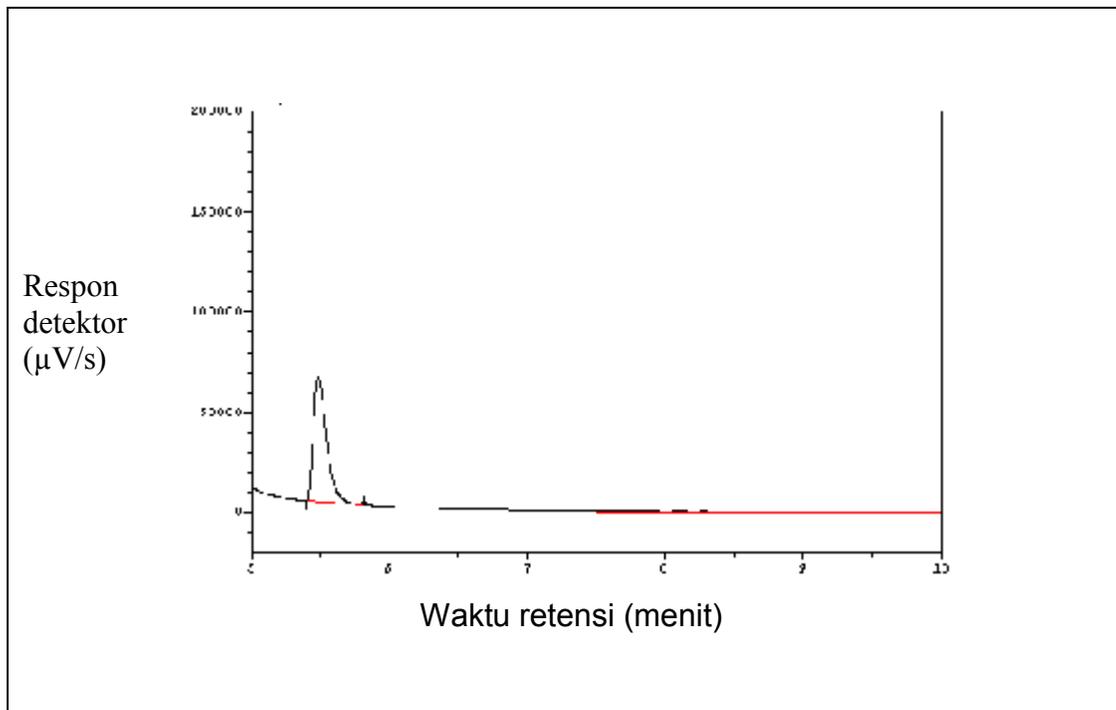
Keterangan:

A = Unit Utama

B = Sistem Kontrol



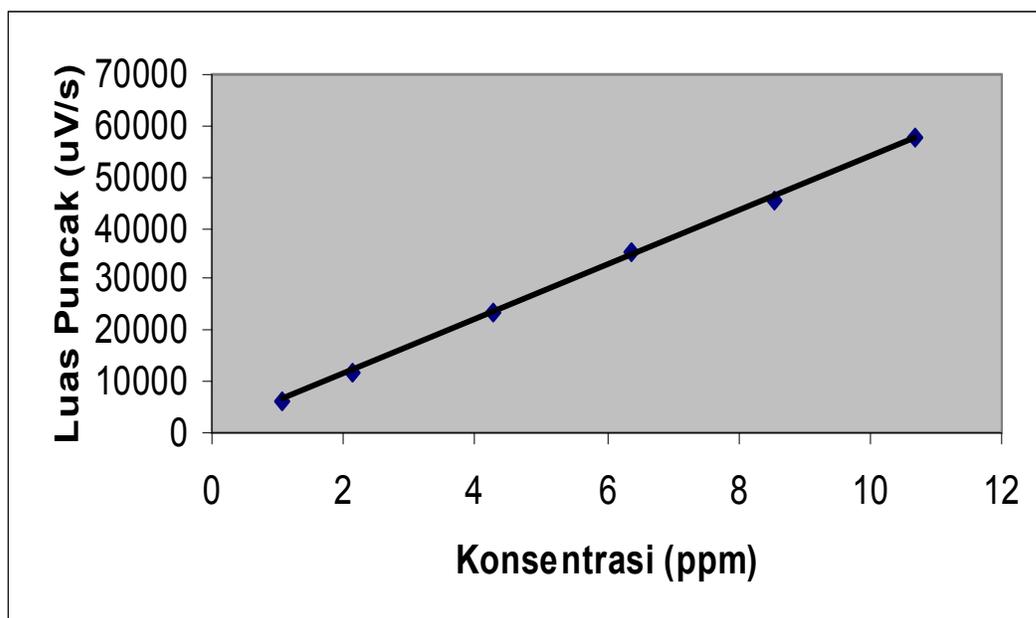
Gambar 7. Pengambilan darah mencit melalui sinus orbital



Gambar 8. Kromatogram standar NDMA pada kondisi analisis terpilih

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C ; suhu detektor 220°C ; suhu kolom 130°C ; laju alir gas pembawa (He) 1,0 mL/menit; volume penyuntikan 5,0 μL .



Gambar 9. Kurva Kalibrasi Standar NDMA

Keterangan:

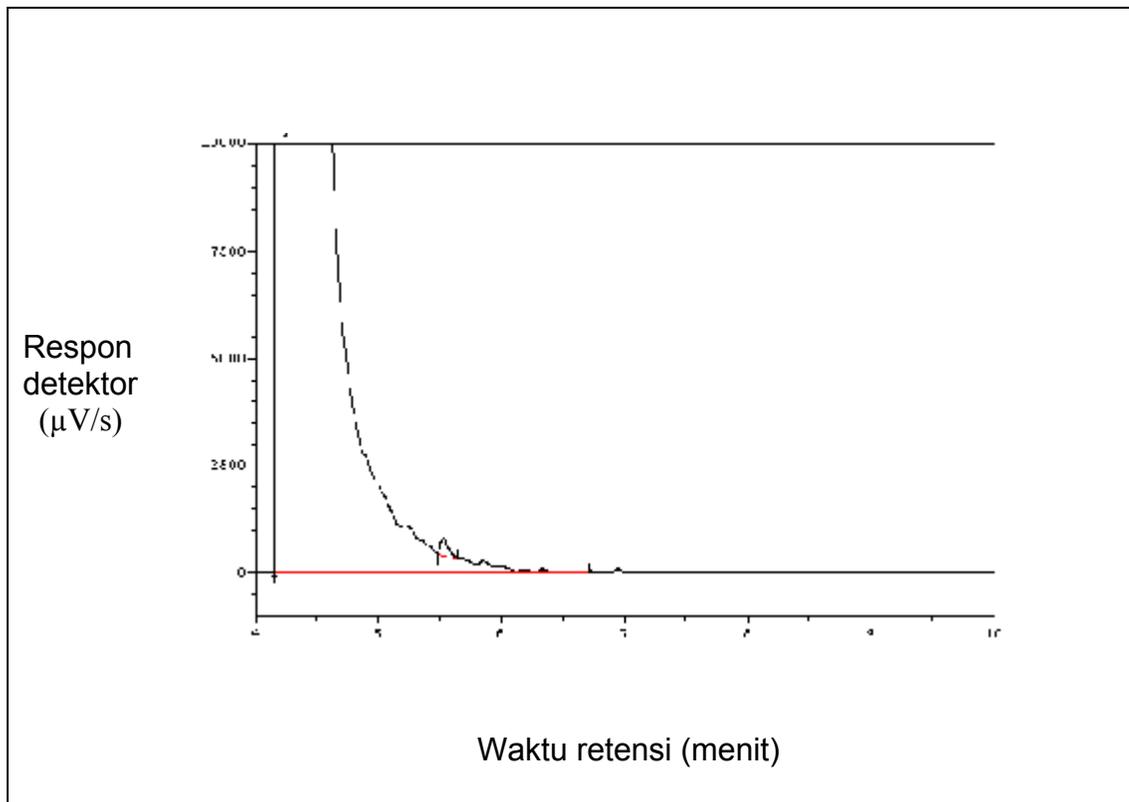
Persamaan regresi linier kurva kalibrasi standar NDMA:

$$y = 796,5729969 + 5295,996433 x$$

dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,9996809845

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 220°C; suhu kolom 130°C; laju alir gas pembawa (He) 1,0 mL/menit; volume penyuntikan 5,0 μ L.



Gambar 10. Kromatogram NDMA pada sampel darah mencit dari kelompok kontrol positif

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C ; suhu detektor 220°C ; suhu kolom 130°C ; laju alir gas pembawa (He) 1,0 mL/menit; volume penyuntikan $5,0 \mu\text{L}$.

Tabel 4
Pemilihan kondisi optimum untuk analisis NDMA dalam diklormetan
dengan variasi suhu kolom dan kecepatan alir gas pembawa

Suhu kolom (°C)	Kecepatan alir gas pembawa (mL/menit)	tr	Jumlah lempeng teoritis (N)	HETP	Resolusi
130	0,50	8,697	15622,633	0,3200	6,400
	1,00	5,496	46908,852	0,1066	9,258
150	0,50	7,658	16553,100	0,3020	4,628
	1,00	4,184	26240,485	0,1905	5,807
170	0,50	6,999	8389,303	0,5959	2,254
	1,00	3,964	5794,023	0,8630	3,068

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 220°C; volume penyuntikan 5,0 µL.

Tabel 5
Data kurva kalibrasi standar NDMA

Konsentrasi (ppm)	Luas Puncak NDMA (μV/s)
1,07	6439
2,13	11888
4,26	23449
6,39	35338
8,53	45161
10,7	57694

Keterangan:

Persamaan regresi linier kurva kalibrasi NDMA :

$$y = 796,572 + 5295,9964 x \text{ dengan koefisien korelasi } r = 0,9996$$

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 220°C; suhu kolom 130°C; laju alir gas pembawa (He) 1,0 mL/menit; volume penyuntikan 5,0 μ L.

Tabel 6
Data linearitas, batas deteksi dan kuantitasi NDMA

Konsentrasi (ppm)	Luas Puncak NDMA ($\mu\text{V/s}$)	Luas Puncak berdasarkan	
		persamaan regresi (y1)	$(y-y_1)^2$
1,07	6439	6463,29	590,0041
2,13	11888	12077,05	35739,9025
4,26	23449	23357,52	8368,5904
6,39	35338	34637,99	490014,0001
8,53	45161	45971,42	656780,5764
10,7	57694	57463,73	53204,2729
			$\Sigma = 1244697,346$

$$S (y/x) = 557,8300247$$

$$b = 5295,9964$$

$$x \text{ rerata} = 5,51333$$

$$S_{x_0} = 0,10533051327$$

$$V_{x_0} = 0,01910469964$$

$$\text{LOD} = 0,31 \text{ ppm}$$

$$\text{LOQ} = 1,05 \text{ ppm}$$

Tabel 7
Data uji presisi NDMA

Konsentrasi (ppm)	Luas Puncak	Konsentrasi		Simpangan baku (SD)	Koefisien variasi (KV) (%)
		pengukuran (xi) (ppm)	Konsentrasi rata-rata (ppm)		
1,07	6621	1,0998	1,0836	0,0134	1,24
	6439	1,0654			
	6552	1,0867			
	6573	1,0907			
	6492	1,0754			
4,62	22265	4,0537	4,0845	0,0879	2,15
	21475	3,9045			
	22717	4,1390			
	23585	4,3029			
	22100	4,0225			
10,7	56950	10,6029	10,4824	0,3252	3,10
	57435	10,6946			
	55037	10,2418			
	58122	10,8243			
	54010	10,0479			

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 220°C; suhu kolom 130°C; laju alir gas pembawa (He) 1,0 mL/menit; volume penyuntikan 5,0 µL.

Tabel 8
Data Uji Perolehan Kembali NDMA

Konsentrasi dalam darah (ppm)	Luas Puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi Terukur (setelah dikalikan faktor pengenceran) (ppm)	upk (%)	upk rata-rata (%)
1,004	3677	1,088	108,34	113,39
	3845	1,152	114,66	
	3912	1,176	117,18	
4,016	11445	4,022	100,13	105,66
	11890	4,190	104,32	
	12762	4,518	112,52	
10,04	24975	9,130	90,94	93,94
	26215	9,598	95,61	
	26125	9,566	95,27	

Keterangan:

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 220°C; suhu kolom 130°C; laju alir gas pembawa (He) 1,0 mL/menit; volume penyuntikan 5,0 μL .

Tabel 9
Data penetapan kadar NDMA pada tiap-tiap kelompok mencit

Kelompok	Luas Puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi NDMA (ppm)
I (kontrol positif)	6952	2,325
II (kelompok uji 1)	-	TD
III (kelompok uji 2)	-	TD
IV (kelompok uji 3)	-	TD
V (kontrol negatif)	-	TD

Keterangan:

TD = Tidak terdeteksi

Kadar NDMA ditentukan dari 1,0 mL darah dari tiap ekor mencit, diekstraksi dengan 2,0 mL diklormetan.

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 220°C; suhu kolom 130°C; laju alir gas pembawa (He) 1,0 mL/menit; volume penyuntikan 5,0 μL .

Lampiran 1

Cara memperoleh persamaan regresi linier

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi.yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum x.y) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{(N(\sum x^2) - (\sum x)^2)(N(\sum y^2) - (\sum y)^2)}}$$

Lampiran 2
Cara perhitungan uji presisi

$$\text{Rata-rata} \quad : \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\text{Simpangan baku} \quad : \quad SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{Koefisien variasi} \quad : \quad KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Contoh:

Hasil pengukuran standar NDMA untuk data presisi konsentrasi rendah :

Konsentrasi rata-rata (\bar{x}) = 1,0836 ppm

$$SD = \sqrt{\frac{(1,0998 - 1,0836)^2 + \dots + (1,0754 - 1,0836)^2}{5-1}} = 0,0134$$

$$KV = \frac{0,0134}{1,0836} \times 100\% = 1,24\%$$

Lampiran 3

Cara perhitungan uji perolehan kembali

Perhitungan UPK dengan metode plasebo :

$$\text{Persen Perolehan Kembali: } \% \text{ UPK} = \frac{\textit{konsentrasidiperoleh}}{\textit{konsentrasisebenarnya}} \times 100\%$$

Contoh:

Persamaan kurva kalibrasi NDMA : $y = 796,5729969 + 5295,996433 x$

y = luas puncak NDMA ($\mu\text{V/s}$)

x = konsentrasi NDMA (ppm)

Misalnya pada konsentrasi 1,004 ppm, diperoleh luas puncak sebesar 3677

$\mu\text{V/s}$ (y)

$$y = 796,5729969 + 5295,996433 x$$

$$3677 = 796,5729969 + 5295,996433 x$$

$$x = 0,54388 \text{ ppm} \times \text{faktor pengenceran}$$

$$= 0,54388 \text{ ppm} \times 2$$

$$= 1,0878 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ UPK} = \frac{1,0878}{1,004} \times 100\% = 108,34\%$$

Lampiran 4

Cara perhitungan batas deteksi, batas kuantitasi dan linearitas

$$\text{Simpangan baku residual} : S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}}$$

$$\text{Batas deteksi} : \text{LOD} = \frac{3 \times S(y/x)}{b}$$

$$\text{Batas kuantitasi} : \text{LOQ} = \frac{10 \times S(y/x)}{b}$$

$$\text{Standar deviasi dari fungsi} : S_{x0} = \frac{S(y/x)}{b}$$

$$\text{Koefisien variasi dari fungsi} : V_{x0} = \frac{S_{x0}}{x}$$

Lampiran 5

Cara perhitungan kadar NDMA dalam sampel

Contoh perhitungan kadar NDMA dalam sampel:

Persamaan kurva kalibrasi NDMA : $y = 796,572 + 5295,9964 x$

y = luas puncak NDMA ($\mu\text{V/s}$)

x = konsentrasi NDMA (ppm)

Misalnya pada kelompok mencit kontrol positif

Luas puncak NDMA dalam sampel = $4205 \mu\text{V/s}$ → diplot ke persamaan

regresi linier, maka $x = 0,6436$ ppm, kemudian dikalikan dengan faktor

pengenceran, maka kadar NDMA dalam 1 mL darah mencit = $0,6436 \text{ ppm} \times 2$

= $1,287$ ppm.

Lampiran 6
Sertifikat analisis standar NDMA

2009年 5月14日 (水) 10:22 発行済/2278 FAX:03-5852-5813 R.007
CERTIFICATE OF ANALYSIS : 147-03781 1/1 4-2



Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8606, Japan

Certificate of Analysis

Product Number : 147-03781
Chemical Name : N-Nitrosodimethylamine Standard
Grade : for GC Chromatography
Lot Number : KWD0800
Unit : 1g

TEST

Appearance
Solubility in water
Water
Assay (GC)
Date of GC-Release
Expiration date 2 year

SPECIFICATION

Pale yellow-yellow, clear liquid
to pass test
max. 0.2%
min. 99.5%

RESULT

Passed
Clear
0.26%
100.0%
Feb. 23, 2009
2011.02

M. Hanawa
Mitsuo Hanawa, General Manager
Q.A. Department

This is an electronically generated document.

Date of Issue : May 12, 2008
Issuing Number : 7495531

Lampiran 7
Sertifikat analisis vitamin C



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 Pharm. 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