

**PENETAPAN KADAR VITAMIN C DALAM KACANG POLONG SECARA
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS KINERJA TINGGI DENSITOMETRI**

KOBA LEONARD ARNOLD PAUL

0706197490



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI EKSTENSI

DEPOK

2010

**PENETAPAN KADAR VITAMIN C DALAM KACANG POLONG SECARA
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS KINERJA TINGGI DENSITOMETRI**

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

Oleh :

KOBA LEONARD ARNOLD PAUL

0706197490



DEPOK

2010

SKRIPSI : PENETAPAN KADAR VITAMIN C DALAM KACANG POLONG
SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS KINERJA TINGGI
DENSITOMETRI

NAMA : Koba Leonard Arnold Paul

NPM : 0706197490

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JANUARI 2010



DR. HARMITA, APT

PEMBIMBING I

DR. HERMAN SURYADI, M.S, APT

PEMBIMBING II

Tanggal lulus ujian Sidang Sarjana : 11 Januari 2010

Penguji I : Dr. Arry Yanuar M.Si.....

Penguji II : Prof. Dr. Atiek Soemiati M.S.....

Penguji III : Sutriyo M.Si., Apt.....

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yesus, karena atas segala anugerah dan kebaikan-Nya dan karena dari-Nya datang pengetahuan dan kepandaian sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi ini.

Skripsi yang berjudul Penetapan Kadar Vitamin C dalam Kacang Polong secara Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi Densitometri ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi, Departemen Farmasi Universitas Indonesia. Penelitian dalam rangka penyusunan skripsi ini dilakukan sepenuhnya di Laboratorium Kimia Kuantitatif, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis hendak mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Harmita, Apt selaku pembimbing I dan Bapak Dr. Herman Suryadi, MS, Apt selaku pembimbing II yang telah bersedia memberikan bimbingan dan pengarahan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MSi, Apt selaku Ketua Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia yang telah memberikan kesempatan penulis melakukan penelitian.
3. Ibu Dra. Juheini Amin, MSi, Apt, selaku pembimbing akademik yang telah memberikan nasihat dan bimbingan.

4. Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.Si, selaku Ketua Program Sarjana Farmasi Ekstensi yang telah memberikan kesempatan penulis melakukan penelitian.
5. Bapak Drs. Hayun, MSi, selaku kepala Laboratorium Kimia Kuantitatif Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah mengizinkan penulis menggunakan ruang dan fasilitas laboratorium selama penelitian.
6. Para karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu terlaksananya penelitian ini, khususnya Pak Rustam atas segala bantuannya di Laboratorium Kimia Kuantitatif.
7. Papa dan Mami yang selalu memberikan doa, kasih sayang dan dukungan moril serta materiil. Khusus buat almarhumah Mama, yang memberikan ilmu kehidupan sehingga penulis selalu kuat secara mental dalam menjalankan pendidikan dan dalam proses penyelesaian skripsi.
8. Seluruh teman-teman seangkatan Farmasi yang tidak dapat disebutkan satu per satu dan teman-teman KBI Kimia Farmasi.
9. Berbagai pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangannya, baik dari segi ilmiah maupun penyajiannya. Penulis berharap penelitian ini dapat bermanfaat bagi rekan-rekan Farmasi khususnya dan para pengembang ilmu pengetahuan pada umumnya.

Depok, 2009

Penulis

ABSTRAK

Kacang polong (*Pisum sativum* L.) yang dikenal masyarakat sebagai salah satu bahan pangan yang bergizi, kini digunakan sebagai bahan baku kosmetik. Kacang polong berkhasiat sebagai *anti aging*, anti iritasi, *body care*, *moisturizing care*, *elastifying*, dan pemutih kulit. Salah satu kandungan dalam kacang polong yaitu vitamin C memiliki kemampuan menghambat pembentukan melanin dan melindungi kulit dari sinar UV yang dapat menyebabkan kerusakan kulit. Penelitian ini dilakukan untuk menetapkan kadar vitamin C dalam kacang polong dan ekstrak kacang polong secara KLTKT Densitometri. Vitamin C dioksidasi terlebih dahulu menjadi asam dehidroaskorbat dan selanjutnya menjadi asam 2,3-diketogulonat dimana masing-masing akan bereaksi dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin membentuk senyawa bis 2,4-dinitrofenilhidrazon. Kondisi analisis menggunakan lempeng KLTKT silika gel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam, campuran kloroform-etil asetat (1:1) sebagai fase gerak, dan dianalisis pada λ 505 nm. Hasil validasi metode analisis menunjukkan koefisien variasi kurang dari 2%; akurasi 95,42% \pm 1,63. Kurva kalibrasi menghasilkan linearitas 0,9993; batas deteksi (LOD) 12,52 ng dan batas kuantitasi (LOQ) 41,72 ng. Kadar vitamin C pada kacang polong *snap pea* dan kacang polong *snow pea* masing-masing 35,79 mg/100 g dan 38,96 mg/100 g. Sedangkan konsentrasi vitamin C dalam ekstrak kacang polong yang diperoleh dari Cognis yaitu 7,23 μ g/g.

Kata kunci : Kacang Polong, vitamin C, hidrazon, kromatografi lapis tipis
kinerja tinggi, densitometri.

xii + 89 hlm.; gbr.; tab.; lamp.

Bibliografi: 32 (1966-2009)



ABSTRACT

Pea (*Pisum sativum* L.), which is commonly known as nutritious food, now has become raw-material for bioactive compound in the cosmetic. Pea is used as anti aging, anti irritant, body care, moisturizing, elastifying, and whitening agent. Vitamin C is one of the compounds contained in the pea that can inhibit melanin and protected skin from UV which induced skin damage. The proposed research, was aimed to quantify the vitamin C contained in the pea and pea extract by using High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) Densitometry. Vitamin C was oxidized to become dehydroascorbic acid further become 2,3-diketogulonic acid and each of these compounds then would be reacted with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form bis 2,4-dinitrophenylhydrazone. The analysis would be conducted under the condition silica gel 60 F₂₅₄ HPTLC plate functioning as the static phase, a mixture of chloroform-ethyl acetate (1:1) functioning as mobile phase, and the analysis will be carried out under λ 505 nm. The validation of analytical method shows that coefficient of variation (CV) is less than 2% with 95,42% \pm 1,63 of accuracy. Calibration curve shows 0,9993 in linearity; limit of detection (LOD) is 12,52 ng and limit of quantification (LOQ) is 41,72 ng. The quantity of vitamin C contained in the analyzed snap pea and snow pea is 35,79 mg/100 g and 38,96 mg/100 g respectively. While the concentration of the vitamin C in pea extract from the Cognis is 7,23 μ g/g.

Keywords : Pea, vitamin C, hydrazone, high performance thin layer chromatography, densitometry.

xii + 89 pages; pictures; tables; appendixes.

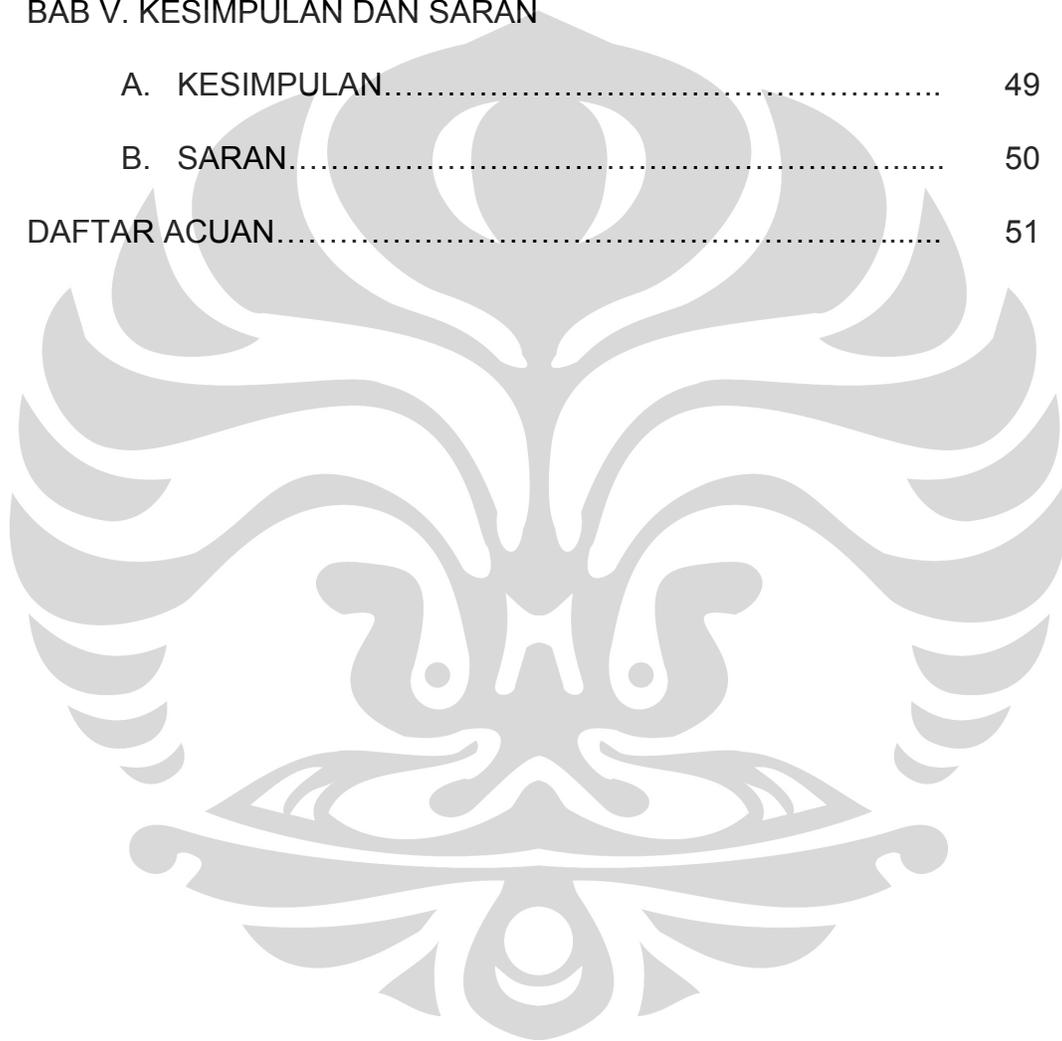
Bibliography: 32 (1966-2009).



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN	
A. LATAR BELAKANG.....	1
B. TUJUAN PENELITIAN.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. KACANG POLONG.....	5
B. RADIKAL BEBAS.....	8
C. ASAM ASKORBAT.....	10
D. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS.....	15
E. VALIDASI METODE ANALISIS.....	23
BAB III. ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA	
A. LOKASI.....	29
B. ALAT.....	29
C. BAHAN.....	29

D. CARA KERJA.....	30
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. HASIL.....	39
B. PEMBAHASAN.....	43
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. KESIMPULAN.....	49
B. SARAN.....	50
DAFTAR ACUAN.....	51



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur asam askorbat.....	10
2. Mekanisme penghambatan vitamin C terhadap radikal bebas.....	13
3. Reaksi antara asam dehidroaskorbat dan asam 2,3-diketogulonat dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin menghasilkan bis 2,4-dinitrofenilhidrazon.....	14
4. Perbedaan bentuk antara kacang polong <i>snap pea</i> dan kacang polong <i>snow pea</i>	57
5. Asam askorbat dari sampel kacang polong <i>snap pea</i> yang direaksikan dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin menghasilkan bercak berwarna orange.....	57
6. Densitogram senyawa hidrazon 20 ppm dengan volume penotolan 5 μ L.....	58
7. Spektrum serapan senyawa hidrazon.....	58
8. Kurva kalibrasi senyawa hidrazon.....	59
9. Densitogram senyawa hidrazon sampel kacang polong	
a. Kacang polong <i>snap pea</i>	59
b. Kacang polong <i>snow pea</i>	60

c. Ekstrak kacang polong Actiwhite®	60
d. Ekstrak kacang polong Actiwhite® yang diadisi dengan vitamin C baku.....	61
10. Spektrum serapan senyawa hidrazon standard dengan sampel kacang polong	
a. Kacang polong <i>snap pea</i>	61
b. Kacang polong <i>snow pea</i>	62
c. Ekstrak kacang polong Actiwhite®	62
11. Densitogram uji perolehan kembali senyawa hidrazon	
a. Konsentrasi rendah.....	63
b. Konsentrasi sedang.....	63
c. Konsentrasi tinggi.....	64
12. Alat TLC <i>scanner 3</i> (Camag) beserta komputer yang dilengkapi program winCATS.....	64

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pengaruh Lama Inkubasi Pada Pembentukan Senyawa Hidrazon.....	67
2. Nilai Rf Senyawa Hidrazon Pada Variasi Fase Gerak.....	67
3. Kurva Kalibrasi Senyawa Hidrazon.....	68
4. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	69
5. Uji Keterulangan.....	70
6. Uji Perolehan Kembali.....	71
7. Penetapan Kadar Vitamin C dalam Kacang Polong	
a. Kacang Polong <i>Snap Pea</i>	72
b. Kacang Polong <i>Snow Pea</i>	73
8. Penetapan Kadar Sampel Ekstrak Kacang Polong Actiwhite® + Standar Vitamin C Untuk Menentukan Kadar Vitamin C Sebenarnya dalam Ekstrak Kacang polong Actiwhite®.....	74
9. Penetapan Kadar Vitamin C dalam Ekstrak Kacang Polong Actiwhite®.....	75
10. Penetapan Kadar Air Pada Kacang Polong <i>Snap Pea</i> dan <i>Snow Pea</i>	76

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan Kurva Kalibrasi.....	79
2. Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	80
3. Perhitungan Simpangan Baku dan Koefisien Variasi.....	81
4. Perhitungan Uji Perolehan Kembali.....	82
5. Perhitungan Kadar.....	83
6. Perhitungan Kadar Air.....	84
7. Sertifikat Analisa Asam Askorbat.....	85
8. Sertifikat Analisa 2,4-Dinitrofenilhidrazin.....	86
9. <i>Product Data Sheet</i> ekstrak kacang polong Actiwhite®	87
10. Determinasi Kacang Polong (<i>Pisum sativum</i> L.).....	89

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Kacang polong merupakan salah satu tumbuhan yang dikenal oleh masyarakat sebagai salah satu bahan pangan yang bernilai gizi yang tinggi. Sebagai bahan pangan, biasanya kacang polong digunakan sebagai salah satu bahan baku pada pembuatan sup, salad, dan sebagai sayuran (1,9)

Kacang polong merupakan bahan makanan yang menjadi salah satu sumber antioksidan. Zat-zat antioksidan dalam kacang polong yaitu vitamin C, vitamin E (α -tocopherol), asam fenolat, *p*-hidroksibenzoat, ferulat, asam vanilat, kaempferol, dan kuersetin (2).

Selain untuk bahan pangan, kini ekstrak kacang polong digunakan pada bahan kosmetik sebagai *antiaging*, anti-iritasi, *body care*, *moisturizing care*, dan *elastifying*. Ekstrak kacang polong juga ternyata memiliki efek sebagai pemutih kulit (*whitening agent*). Dalam dunia kosmetik, vitamin C memiliki efek pemutih dengan menghambat pembentukan melanin yaitu menghambat oksidasi DOPA dan melindungi kulit dari sinar UV. Vitamin C menambah abilitas kulit dengan menetralkan oksigen reaktif tunggal (*reactive oxygen singlets/O₂*) yang merupakan suatu radikal bebas yang disebabkan oleh radiasi UV, dengan demikian

mencegah dan melindungi kulit dari resiko kerusakan dan kanker kulit (28,29,30).

Vitamin C merupakan salah satu vitamin yang paling dikenal dan banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Vitamin C dibutuhkan oleh manusia sebagai salah satu komponen nutrisi yang esensial. Sebagai suatu antioksidan, vitamin C bekerja dalam tubuh dengan menetralkan radikal bebas (free radical scavengers). Vitamin C tidak dapat diproduksi sendiri oleh tubuh sehingga harus didapat dari luar tubuh, seperti makanan. Kebutuhan manusia akan vitamin C tiap harinya adalah dalam jumlah kecil, dan kelebihannya akan dibuang (3).

Analisis kuantitatif vitamin C ini dapat dilakukan dengan berbagai metode, yaitu secara volumetri, spektrofotometri, kromatografi cair kinerja tinggi, dan secara kromatografi lapis tipis densitometri. Metode KLT sampai saat ini merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk analisis asam askorbat, baik secara kualitatif maupun kuantitatif (7,8).

Metode KLT digunakan karena penyiapan sampel, peralatan dan metode yang digunakan relatif lebih sederhana, waktu analisis relatif cepat yaitu dalam satu kali elusi dapat menganalisis lebih dari satu sampel. Selain itu biaya operasional yang dibutuhkan juga lebih murah. Sekarang terdapat KLTKT (Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi), yang memiliki keuntungan dengan lebih meningkatkan efisiensi pemisahan dan

resolusi, mempersingkat waktu analisis, dan meningkatkan sensitivitas detektor dibandingkan KLT konvensional.

Sebelum melakukan analisis kuantitatif vitamin C secara KLTKT densitometri, terlebih dahulu dilakukan optimasi dan validasi agar didapatkan metode analisis yang dapat dipercaya. Dengan dilakukan optimasi dan validasi ini, diyakini bahwa metode KLTKT densitometri dapat digunakan untuk analisis vitamin C yang terdapat dalam kacang polong.

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Mendapatkan kondisi analisis optimum vitamin C secara kromatografi lapis tipis kinerja tinggi densitometri setelah direaksikan dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin.
2. Mendapatkan hasil validasi metode analisis yang diperoleh.
3. Mengetahui kadar vitamin C dalam kacang polong dan ekstrak kacang polong secara kromatografi lapis tipis kinerja tinggi densitometri.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. KACANG POLONG

1. Klasifikasi kacang polong adalah sebagai berikut (1,9):

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Bangsa	: Viciaeae
Genus	: Pisum
Spesies	: <i>Pisum sativum</i> Linn
Sinonim	: <i>Lathyrus oleraceus</i> Lam, <i>Pisum vulgare</i> Jundz.

Kacang polong (*Pisum sativum* L., suku polong-polongan atau Fabaceae) merupakan tumbuhan penghasil sayuran berupa biji berwarna hijau. Kacang polong didatangkan oleh penjajah Belanda ke Indonesia karena sayuran ini populer di Eropa sebagai bagian dari salad atau sup.

Biji kacang polong kaya karbohidrat serta protein dan cepat membuat kenyang ketika dimakan. Sejak ribuan tahun lalu telah

dimanfaatkan sebagai bahan pangan namun sekarang penggunaannya lebih banyak sebagai sayuran atau pakan. Dalam budidaya di Indonesia, kacang polong tumbuh baik di daerah pegunungan berhawa sejuk dengan ketinggian 700 meter di atas permukaan laut, pada suhu seperti di daerah asalnya. Kacang polong ini terbagi atas dua macam yaitu kacang polong *snap pea* dengan ukuran yang lebih besar dan kacang polong *snow pea* dengan ukuran yang lebih kecil dibandingkan kacang polong *snap pea* (Gambar 4).

2. Tempat tumbuh (9)

Habitat tanaman kacang polong di semak, tanaman ini sangat baik pada cahaya matahari penuh sampai mulai sangat panas. Pengairan yang teratur sangat baik untuk tanaman kacang polong. Biji tanaman kacang polong ditanam dengan kedalaman 2,5-5 cm pada tanah dengan temperatur mencapai 10°C dan tanaman tumbuh baik pada temperatur 13-18°C. Negara-negara dengan produksi kacang polong terbesar saat ini diantaranya Kanada, Amerika Serikat, Eropa, Cina, India, Rusia, dan Australia.

3. Morfologi (9)

Tanaman kacang polong dapat tumbuh sampai 2 m, dengan daun majemuk, menyirip ganjil, anak daun bulat telur, pangkal tumpul, ujung runcing tepi rata, permukaan halus, panjang 1-3 cm, lebar 1-2 cm, pertulangan menyirip berwarna hijau. Batangnya tegak, bulat, berlubang, permukaan halus, hijau keputih-putihan. Bunganya tunggal, kupu-kupu, tiap buku terdapat satu atau dua tangkai, kelopak bentuk corong, ujung bertoreh, benang sari banyak, putik satu, putih kehijauan, ungu. Buahnya polong, berisi 6-7 biji, masih muda hijau setelah tua putih kekuningan. Bijinya bulat, masih muda hijau setelah tua coklat kekuningan. Akarnya tunggang berwarna putih kotor.

4. Kandungan kimia (10,28)

Kacang polong merupakan salah satu sumber tumbuhan yang memiliki kandungan kimia antioksidan seperti vitamin C, vitamin E (α -, γ -, dan δ -tocopherol), asam fenolat, *p*-hidroksibenzoat, ferulat, asam vanilat, kaempferol, dan kuersetin. Selain itu kacang polong juga mengandung vitamin B kompleks, protein, dan mineral-mineral. Ekstrak kacang polong kini digunakan secara topikal sebagai produk *antiaging* di muka, *antiiritasi*, *body care*, *moisturizing care*, *elastifyng*, dan *whitening agent*.

B. RADIKAL BEBAS (*FREE RADICAL*) (4)

1. Definisi

Radikal bebas adalah sekelompok bahan kimia baik berupa atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya. Merupakan juga suatu kelompok bahan kimia dengan reaksi jangka pendek yang memiliki satu atau lebih elektron bebas

2. Pembentukan Radikal Bebas dalam Sel

Radikal bebas diproduksi dalam sel yang secara umum melalui reaksi pemindahan elektron, menggunakan mediator enzimatik atau non-enzimatik. Produksi radikal bebas dalam sel dapat terjadi secara rutin maupun sebagai reaksi terhadap rangsangan. Secara rutin adalah superoksida yang dihasilkan melalui aktivasi fagosit dan reaksi katalisa seperti ribonukleotida reduktase. Sedang pembentukan melalui rangsangan adalah kebocoran superoksida, hidrogen peroksida dan kelompok oksigen reaktif (ROS) lainnya pada saat bertemunya bakteri dengan fagosit teraktifasi. Pada keadaan normal sumber utama radikal bebas adalah kebocoran elektron yang terjadi dari rantai transport elektron, misalnya yang ada dalam mitokondria dan endoplasma retikulum dan molekul oksigen yang menghasilkan superoksida.

Dalam kondisi yang tidak lazim seperti radiasi ion, sinar ultraviolet, dan paparan energi tinggi lainnya, dihasilkan radikal bebas yang sangat berlebihan. Radikal bebas berbahaya karena dapat terjadi reaksi berantai. Dalam rangka mendapatkan stabilitas kimia, radikal bebas tidak dapat mempertahankan bentuk asli dalam waktu lama dan segera berikatan dengan bahan sekitarnya. Radikal bebas akan menyerang molekul stabil yang terdekat dan mengambil elektronnya, zat yang terambil elektronnya akan menjadi radikal bebas juga sehingga akan memulai suatu reaksi berantai, yang akhirnya terjadi kerusakan sel tersebut.

Oleh karena radikal bebas sangat reaktif, sehingga dapat bereaksi dengan berbagai molekul lain seperti protein, lemak, dan DNA. Lemak merupakan biomolekul yang paling rentan terhadap serangan radikal bebas karena mengandung sumber *poly unsaturated fatty acid*, yang mudah dirusak oleh bahan-bahan pengoksidasi

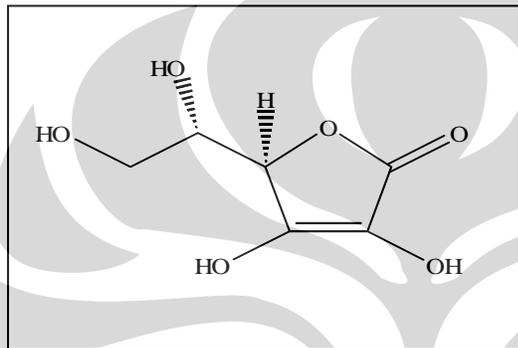
3. Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas dapat ditemukan di lingkungan sekitar. Berbagai sumber dari peningkatan radikal bebas seperti asap rokok, polusi udara, obat-obat tertentu, racun, *highly process foods* dan bahan tambahan makanan, sinar ultraviolet, dan radiasi. Sedangkan dari dalam tubuh dapat berupa proses autooksidasi, oksidasi enzimatik,

dan *respiratory burst* (penggunaan oksigen dalam jumlah besar oleh sel fagositik selama proses fagositosis).

C. ASAM ASKORBAT

1. Monografi (11,12)



Gambar 1. Struktur asam askorbat (11)

Rumus Molekul : $C_6H_8O_6$

Bobot Molekul : 176,13

Sinonim : Vitamin C

Pemerian : Hablur atau serbuk putih agak kuning, tidak berbau, rasa asam. Oleh pengaruh cahaya lambat laun menjadi berwarna gelap.

Kelarutan : Larut dalam 3,5 bagian air, dalam 25 bagian alkohol, dan dalam 10 bagian metil alkohol, tidak larut dalam eter, kloroform, dan benzen.

Keasaman : Larutan 5% memiliki pH antara 2,2-2,5

Suhu Lebur : Lebih kurang 109°C

2. Farmakologi

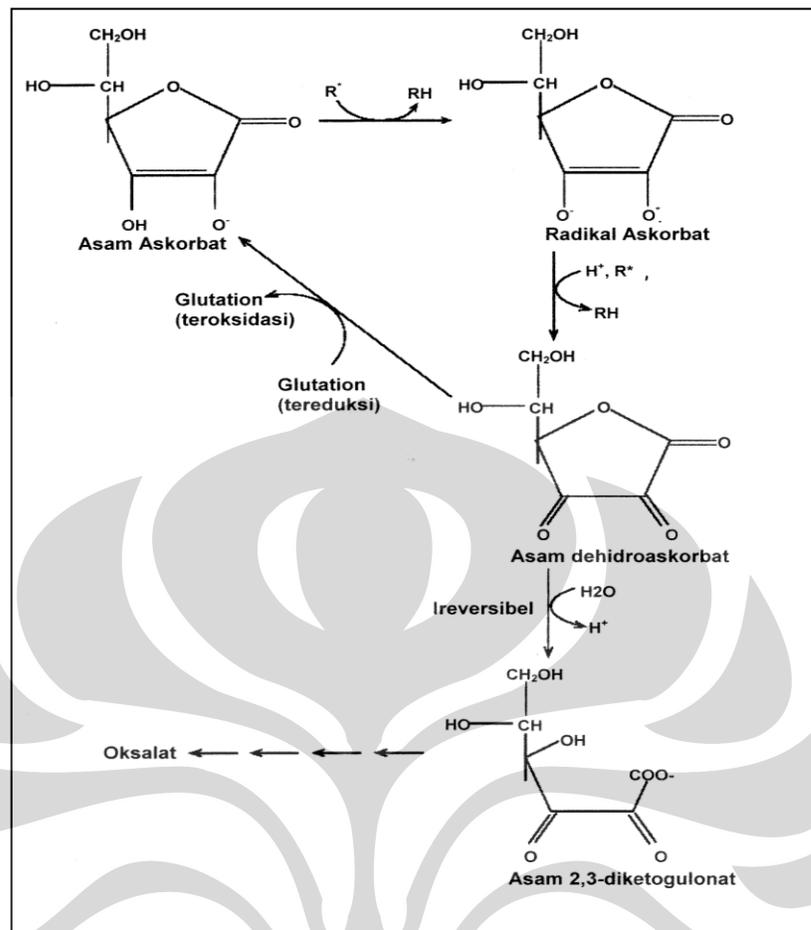
Vitamin C berperan sebagai kofaktor dalam sejumlah reaksi hidroksilasi dengan memindahkan elektron ke ion logam dari suatu enzim yang harus berada dalam keadaan tereduksi. Salah satu contohnya adalah kolagen, yaitu protein bahan penunjang utama dalam tulang rawan dan jaringan ikat. Bila sintesis kolagen terganggu, maka mudah terjadi kerusakan pada dinding pembuluh yang berakibat perdarahan (15). Peran vitamin C sebagai donor elektron ini memungkinkan pada kondisi tertentu dapat bersifat sebagai antioksidan.

Vitamin C memiliki fungsi penting dalam pembentukan kolagen. Kolagen adalah jaringan yang menghubungkan jaringan satu dan jaringan lainnya. Kolagen terdiri dari 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 (13,14). Vitamin C bekerja dengan mempercepat perubahan residu prolin dan lisin pada

prokolagen menjadi hidroksiprolin dan hidroksilisin pada sintesis kolagen (15).

Vitamin C juga berperan dalam metabolisme lemak dan protein. Tingginya konsentrasi vitamin C dalam kelenjar adrenal, serta kehilangannya selama kelenjar adrenal terstimulasi menunjukkan perlunya vitamin C selama kondisi demam.

Vitamin C dapat menghambat radikal bebas dengan melepaskan satu atom hidrogen kemudian berikatan dengan satu radikal bebas (5). Radikal bebas sendiri sangat reaktif dengan menangkap elektron molekul stabil yang terdekat (peroksidasi lemak, kerusakan protein, kerusakan DNA), zat yang terambil elektronnya akan menjadi radikal bebas juga sehingga akan memulai suatu reaksi berantai, yang akhirnya terjadi kerusakan sel tersebut (4). Vitamin C bekerja yaitu dengan menangkap radikal bebas dengan cara melepaskan satu atom hidrogen kemudian berikatan dengan satu radikal bebas. Dengan mekanisme seperti itu, reaksi radikal dapat dihancurkan atau dikurangi energinya. Pemberian atom hidrogen ini akan menstabilkan radikal bebas dan berhenti melakukan gerakan ekstrim, sehingga tidak merusak lipida, protein, dan DNA (materi genetik) yang menjadi target kerusakan sel (5). Sebagai antioksidan vitamin C juga dapat menekan pembentukan karsinogenik nitrosoamin pada diet nitrit dan nitrat dalam saluran gastrointestinal (6).



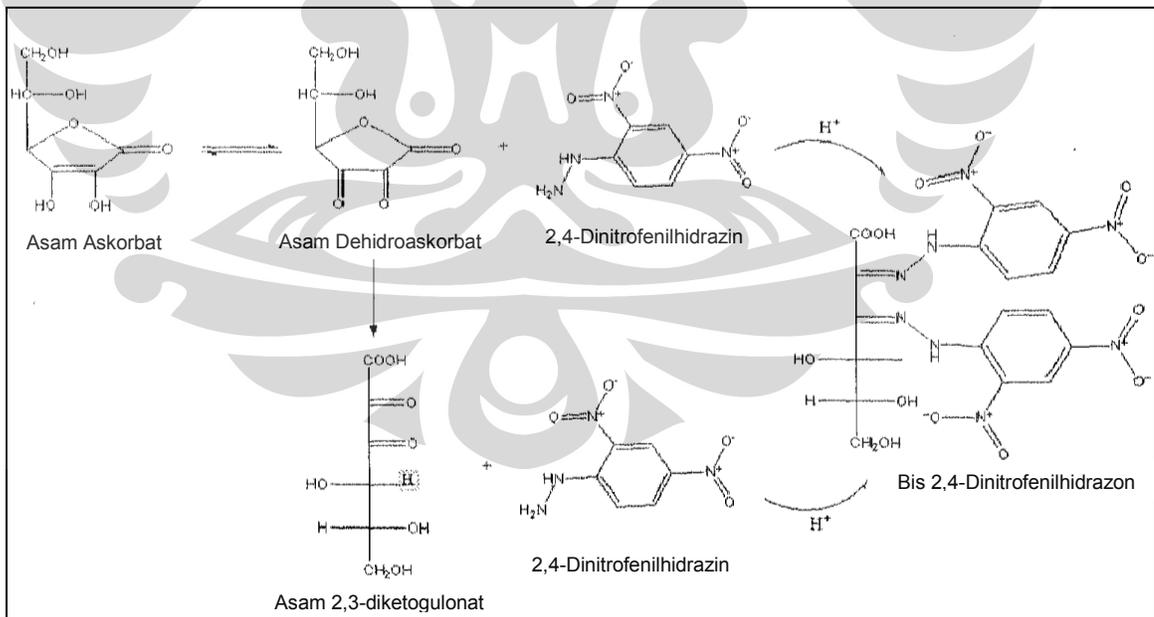
Gambar 2. Mekanisme penghambatan vitamin C terhadap radikal bebas (6)

Dalam dunia kosmetik, vitamin C memiliki efek pemutih dengan menghambat oksidasi DOPA sehingga menghambat pembentukan melanin yang menyebabkan kulit menjadi lebih gelap. Vitamin C menambah abilitas kulit dengan menetralkan oksigen reaktif tunggal (*reactive oxygen singlets/O₂*) yang disebabkan oleh radiasi UV, dengan demikian mencegah dan melindungi kulit dari resiko kerusakan dan kanker kulit. Vitamin C juga menstimulasi sintesis kolagen pada kulit sehingga mencegah terjadinya penuaan dini akibat paparan radiasi UV tersebut (28,29,30).

3. Metode Analisis Vitamin C

Vitamin C dapat dianalisis secara volumetri, spektrofotometri, kromatografi cair kinerja tinggi, dan kromatografi lapis tipis densitometri.

Metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah secara KLT densitometri dengan menggunakan 2,4-dinitrofenilhidrazin. Vitamin C dioksidasi terlebih dahulu menjadi asam dehidroaskorbat kemudian asam 2,3-diketogulonat yang kemudian masing-masing dapat bereaksi dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam suasana asam membentuk senyawa bis-2,4-dinitrofenilhidrazon. Senyawa tersebut memberi warna orange dengan penambahan asam sulfat, yang kemudian diukur pada panjang gelombang sinar tampak (26,27,31).



Gambar 3. Reaksi antara asam dehidroaskorbat dan asam 2,3-diketogulonat dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin menghasilkan bis 2,4-dinitrofenilhidrazon (31,32)

D. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (*THIN LAYER CHROMATOGRAPHY*)

1. Pendahuluan

Kromatografi didefinisikan sebagai suatu prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu sistemnya bergerak berkesinambungan dalam arah tertentu dan di dalamnya zat-zat tersebut menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, ukuran molekul atau kerapatan ion (15).

Teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut terdistribusi di antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase gerak berfungsi membawa zat terlarut melalui media, hingga terpisah dari zat terlarut lainnya. Umumnya zat terlarut dibawa melalui media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen. Fase diam dapat bertindak sebagai penjerap, seperti halnya penjerap alumina yang diaktifkan dan silika gel atau dapat bertindak melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak (17).

Salah satu metode kromatografi yang sering dilakukan dengan fase diam berupa zat padat adalah kromatografi lapis tipis. Kromatografi lapis tipis (KLT) telah dikembangkan lebih dari 30 tahun lalu untuk pemisahan dan penentuan semi kuantitatif dari komponen-

komponen yang terdapat pada campuran yang kompleks. Dan dalam 10 tahun terakhir ini, penggunaan metode KLT untuk pemisahan dan penentuan kuantitatif banyak senyawa organik dan inorganik sangat ditingkatkan. Peningkatan ini kemungkinan disebabkan adanya kemajuan instrumentasi dan langkah-langkah untuk analisis KLT dapat dilakukan secara otomatis, yaitu dengan densitometri (18).

2. Penggunaan KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sering digunakan untuk analisis kualitatif skala besar dan dapat juga digunakan untuk analisis kuantitatif.

Sekarang ini metode KLT banyak diaplikasikan untuk :

- a. Menganalisis kemurnian dari suatu senyawa secara sederhana.
- b. Memisahkan dan mengidentifikasi komponen-komponen zat dalam suatu campuran.
- c. Menganalisis komponen-komponen yang terkandung dalam suatu campuran senyawa secara kuantitatif.

Penggunaan metode KLT yang semakin luas dapat disebabkan metode ini memiliki banyak kelebihan, diantaranya adalah (19) :

- a. Penggunaannya mudah, aplikasinya luas untuk bermacam-macam sampel, sensitivitasnya tinggi, waktu pemisahannya cepat dan tidak memakan biaya mahal.
- b. Polaritas pelarut atau jenis campuran pelarut dapat diubah berdasarkan percobaan, mudah untuk mengubah fase gerak.
- c. Memungkinkan untuk mengelusi beberapa cuplikan sekaligus sehingga waktu yang dibutuhkan untuk jumlah sampel yang banyak dapat lebih singkat.
- d. Jumlah cuplikan dan pelarut yang digunakan sedikit.
- e. Memungkinkan dilakukan penotolan cuplikan berganda.
- f. Tidak memerlukan kemurnian sampel yang sama seperti pada KCKT.

Selain itu KLT memiliki kekurangan yaitu keterulangan yang buruk bila analisis dilakukan pada lempeng yang berbeda. Hal ini disebabkan adanya kesulitan untuk membuat lempeng yang terulangan, bahkan dalam satu pabrik sekalipun. Perbedaan keterulangan ini dapat disebabkan variasi dari ukuran partikel ataupun ketebalan lempeng (20).

Kriteria zat yang dapat dianalisa dengan KLT antara lain (21) :

- a. Dapat terdeteksi pada kromatogram, dapat dilarutkan, dapat dielusi dengan fase geraknya.
- b. Tidak bersifat volatil sehingga tidak menguap selama proses elusi dan pengeringan kromatogram.
- c. Harus stabil selama proses kromatografi, baik terhadap cahaya, udara dan pelarut yang digunakan.

Sedangkan hal-hal yang harus diperhatikan untuk pelarut yang digunakan adalah (20) :

- a. Pelarut harus murni, bila perlu disaring kembali
- b. Campuran pelarut hanya boleh digunakan maksimum sampai dua atau tiga kali.
- c. Komposisi campuran dapat berubah karena penyerapan atau penguapan.
- d. Komponen-komponen campuran pelarut mungkin bereaksi satu sama lain.

Hasil pemisahan pada KLT dapat dideteksi dengan menggunakan KLT densitometer. KLT densitometer dapat digunakan untuk analisa kualitatif maupun kuantitatif (disebut juga spektrodensitometri). Proses analisa kualitatif dapat dilakukan dengan membandingkan noda contoh dan noda baku melalui jarak pergerakan dan spektrumnya, sedangkan untuk analisa kuantitatifnya melalui luas atau tinggi puncak kromatogramnya.

3. Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi

Fase diam KLTKT merupakan senyawa anorganik (kadang organik) dengan struktur yang berpori dan luas permukaan yang relatif besar. Pelat KLTKT disiapkan dari material tersebut dengan mengikatnya pada suatu penyangga (gelas, aluminium, plastik), dengan bantuan bermacam pengikat organik atau anorganik. Semakin kecil ukuran partikel dan semakin dekat distribusi ukuran partikelnya, akan meningkatkan efisiensi pemisahan dan resolusi, mempersingkat waktu analisis dan meningkatkan sensitivitas detektor. Rata-rata ukuran partikel adsorben yang digunakan pada KLT konvensional antara 10-50 μm . Pada kromatografi lapis tipis kinerja tinggi, adsorben mempunyai rata-rata ukuran partikel 5 μm . Lempeng ini memiliki tingkat pemisahan yang lebih baik dan membutuhkan jumlah cuplikan yang lebih sedikit (18).

4. Sistem KLT

Pemisahan pada KLT terjadi karena adanya interaksi dari komponen-komponen yang akan dipisahkan dengan fase diam dan fase gerak yang digunakan.

a. Fase Diam (Fase stasioner)

Adsorben/penjerap yang umumnya digunakan adalah silika gel, alumina, kieselghur dan selulosa karena strukturnya yang berpori dan luas permukaannya besar. Ukuran partikel rata-rata dari adsorben tersebut adalah antara 10 dan 50 μm . Adsorben ini melapisi pelat KLT yang dapat terbuat dari gelas, aluminium foil atau plastik (19).

b. Fase Gerak

Fase gerak pada KLT dipilih berdasarkan sifat zat yang ingin dipisahkan dan juga tipe adsorben yang digunakan. Komposisi fase gerak bisa tunggal atau campuran yang terdiri dari tiga sampai empat campuran pelarut dengan proporsi tertentu.

Pemilihan fase gerak sebaiknya memenuhi syarat (22) :

- 1). Fase gerak harus dapat melarutkan zat aktif
- 2). Memberikan nilai R_f antara 0,2-0,8
- 3). Memberikan selektifitas yang cukup baik kepada komponen zat aktif yang akan dipisahkan
- 4). Fase gerak yang digunakan harus memiliki kemurnian dan stabilitas yang baik
- 5). Memiliki viskositas yang rendah
- 6). Tidak toksik

5. Metode Pengembangan KLT (18,19)

a. Metode Pengembangan Menaik (*Linear Ascending Development*)

Metode ini paling sering digunakan pada percobaan KLT. Pada metode ini, fase gerak bergerak naik pada lempeng. Metode ini merupakan metode yang paling sederhana. Fase gerak ditambahkan ke dalam bejana dan bagian paling bawah dari lempeng dicelupkan ke fase gerak. Fase gerak akan bergerak naik berdasarkan aksi kapiler.

b. Metode Pengembangan Mendatar (*Linear Horizontal Development*)

Metode ini membutuhkan waktu yang lebih singkat daripada metode pengembangan menaik karena efek gravitasi tidak mempengaruhi gerakan dari fase gerak. Lempeng diletakkan secara mendatar pada bejana horizontal.

c. Metode Pengembangan Sirkuler (*Circular Development*)

Metode ini memindahkan fase gerak ke pusat dari lempeng KLT yang berbentuk lingkaran dan pengembangan berlangsung keluar dari pusat lempeng. Sampel yang terlarut dalam eluen bergerak menuju tepi lempeng secara konsentris.

d. Metode Pengembangan Antisirkuler (*Anticircular Development*)

Pada metode ini sampel ditotolkan di bagian luar bidang lempeng, dan fase gerak bergerak dari sekeliling lingkaran menuju ke pusat lempeng. Waktu analisis cukup singkat dikarenakan kecepatan fase gerak meningkat selama pengembangan.

e. Densitometri

Deteksi kromatogram merupakan tahap akhir yang penting dalam kromatografi. Teknik *in situ* merupakan cara deteksi yang umum digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkuantitasi kromatogram. Deteksi *in situ* dapat dilakukan dengan pengukuran densitometri. Densitometri merupakan metode yang sering digunakan pada KLT (23).

Seperti halnya spektrofotometer, pada kromatografi lapis tipis dikenal pula beberapa konfigurasi berdasarkan sistem optiknya, yaitu densitometer sistem sinar tunggal dengan panjang gelombang tunggal (*single beam*), sistem sinar tunggal dengan panjang gelombang ganda (*dual wavelength*), dan sistem sinar ganda (*double beam*).

Metode pengukurannya dapat didasarkan atas proses pemantulan dari fotometri resapan (*reflection-absorbtion photometry*), pemantulan dari fluorometri (*reflection-*

fluorometry), dan transmisi dari fotometri resapan (*transmission-absorbtion photometry*) (24). Senyawa yang berwarna dapat diukur absorpsinya pada panjang gelombang sinar tampak (*visible wavelength*), baik dengan menggunakan fotometri resapan (*reflection-absorbtion photometry*) maupun dengan transmisi dari fotometri resapan (*transmission-absorbtion photometry*). Senyawa yang tidak berwarna pada sinar UV dapat diukur dengan pemantulan dari fluorometri (*reflection-fluorometry*).

E. VALIDASI METODE ANALISIS (25)

Validasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metoda analisis antara lain :

1. 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/ absolut (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku/ adisi (*standard addition method*). Pada metode simulasi, persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (eksipten obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 20-80% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi. Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui, maka dapat dipakai metode adisi. Metode adisi dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan.

2. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang

kali oleh analisis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Sedangkan ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Percobaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen.

3. Selektifitas (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 cecaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

4. Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50-150% kadar analit dalam sampel. Di dalam pustaka, sering ditemukan rentang konsentrasi yang digunakan antara 0-200%. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko. 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. Nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan.

5. 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.

a. Batas deteksi (LOD)

$$\text{LOD} = \frac{k \times S_b}{S_I} \quad k = 3$$

b. Batas kuantitasi (LOQ)

$$\text{LOQ} = \frac{k \times S_b}{S_I} \quad k = 10$$

Keterangan :

S_b = simpangan baku respon analitik dari blanko

S_I = arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

6. Ketangguhan metode (*ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sample yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrument, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dll. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara laboratorium dan antar analis.

7. Kekuatan (*robustness*)

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus-menerus dan mengevaluasi respon analitik serta efek pada presisi dan akurasi.

BAB III

ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA

A. LOKASI

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Analisis Instrumen, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

B. ALAT

TLC Scanner (Camag 3), bejana KLT, mikrokapiler 1; 2; 5; μL , komputer dengan software Wincats, printer, timbangan analitik (Acculab ALC-210.4), *waterbath*, *orbit shaker*, oven, lumpang dan alu, pipet volume, dan alat-alat gelas.

C. BAHAN

Kacang polong *snap pea* dan *snow pea* yang diperoleh dari salah satu supermarket yang berada di kota Depok, ekstrak kacang polong Actiwhite[®] sebagai bahan baku untuk kosmetik yang diperoleh dari Cognis, L-ascorbic acid (Takeda), lempeng KLTKT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck), metanol (Merck), kloroform (Mallinckrodt), etil asetat (Merck), eter (Mallinckrodt), heksan (Mallinckrodt), asam asetat (Merck), asam sulfat

(Mallinckrodt), asam oksalat (Merck), thiourea (Merck), 2,4-dinitrofenilhidrazin (Merck), dan 2,6-diklorofenol indofenol Na (Merck).

D. CARA KERJA

1. Pembuatan pereaksi

a) Larutan asam oksalat 4% dalam air

Asam oksalat ditimbang sebanyak 4,0 g kemudian dilarutkan dengan aquadest sampai 100mL.

b) Larutan 2,6-diklorofenol-indofenol 0,5% dalam air

2,6-diklorofenol-indofenol ditimbang sebanyak 500 mg lalu dilarutkan dengan aquadest sampai 100 mL

c) Larutan 2,4-dinitrofenilhidrazin 2% dalam dalam asam sulfat 70%

Pembuatan asam sulfat 70% : sebanyak 73,7 mL asam sulfat diambil kemudian dicukupkan dengan aquadest sampai 100 mL.

2,4-dinitrofenilhidrazin ditimbang sebanyak 2,0 g kemudian dilarutkan sedikit-sedikit dengan asam sulfat 70%. Setelah larut, dicukupkan kembali dengan asam sulfat 70% sampai 100 mL.

2. Pemilihan fase gerak yang sesuai

Larutan baku vitamin C dalam air dibuat dengan konsentrasi 200 ppm. Sebanyak 10 mL diambil, dimasukkan dalam labu ukur 100-mL. Sebanyak 25 mL larutan asam oksalat 4% ditambahkan kemudian diikuti dengan penambahan 2-mL larutan 0,5 % diklorofenol-indofenol dan didiamkan selama 5 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan thiourea sebanyak 10 mg untuk menghilangkan sisa dari reagen pengoksidasi. Lalu air ditambahkan sampai batas 100 mL.

Dari labu ukur 100-mL di atas, diambil 25 mL larutan lalu ditambahkan 4 mL cairan 2% 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam asam sulfat 70%. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam di waterbath kemudian segera didinginkan dengan *icebath* selama 10 menit. Senyawa hidrazon yang terbentuk diekstraksi dengan 3x6 mL etil asetat-asam asetat (98:2) dengan menggunakan corong pisah. Ekstrak kemudian dikumpulkan dan dicukupkan sampai 25 mL.

Larutan tersebut kemudian ditotolkan pada lempeng KLTKT yang telah diaktifkan dengan volume penotolan 5 μ L dan jarak penotolan 1 cm. Kemudian dielusi dengan jarak elusi 8 cm dan dianalisis menggunakan TLC scanner pada panjang gelombang analisis yang didapat dan dibuat spektrum serapannya. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform-etil asetat (1:1); eter-etil asetat-asam

asetat (75:25:4); etil asetat-heksan-asam asetat (50:40:10). Dipilih fase gerak yang menghasilkan nilai Rf yang paling baik.

3. Pemilihan panjang gelombang maksimum menggunakan TLC Scanner

Larutan baku vitamin C dengan konsentrasi 20 µg/mL ditotolkan pada lempeng KLTKT yang telah diaktifkan dengan volume penotolan 5 µL. Kemudian lempeng dielusi dengan fase gerak terpilih, lalu dianalisis dengan TLC scanner pada panjang gelombang 400-600 nm. Dari kurva serapan akan diperoleh panjang gelombang maksimum yang dicatat dan digunakan dalam percobaan.

4. Pembuatan kurva kalibrasi

Larutan baku vitamin C dalam air dibuat dengan konsentrasi 210 ppm dan diencerkan menjadi 21 ppm dan diperlakukan sesuai dengan prosedur.

Larutan baku ini ditotolkan sebanyak 2; 5; 7; 10; 12; 15 µL dengan nilai absolut masing-masing 42 ;105 ;147 ;210 ;252 ;315 ng, pada lempeng KLTKT yang telah diaktifkan dengan jarak penotolan 1 cm. Kemudian lempeng dielusi dengan fase gerak terpilih, lalu dianalisis dengan TLC scanner pada panjang gelombang maksimum. Setelah itu dibuat kurva kalibrasi senyawa hidrazon dan dilakukan analisis hubungan antara konsentrasi dan luas puncak (area) sehingga didapat persamaan garis linier $y = a + bx$.

5. Uji linearitas

Linearitas dari kurva kalibrasi dilihat dengan menghitung koefisien korelasi (r) dari persamaan garis linier dan koefisien fungsi regresi (V_{xo}).

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

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dapat dihitung melalui persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang diperoleh.

7. Uji keterulangan

Larutan baku vitamin C dalam air dibuat dengan konsentrasi 200 ppm dan diencerkan menjadi 20 ppm dan diperlakukan sesuai dengan prosedur.

Larutan baku ini ditotolkan sebanyak 5; 10; 15 μL pada lempeng KLTKT yang telah diaktifkan sejumlah masing-masing enam titik. Kemudian lempeng dielusi dengan fase gerak terpilih, lalu dianalisis dengan TLC scanner pada panjang gelombang maksimum. Parameter keterulangan ditentukan dengan menghitung simpangan baku dan koefisien variasinya. Metode dianggap memiliki keterulangan yang baik jika koefisien variasinya kurang dari atau sama dengan 2%.

8. Uji Perolehan Kembali (UPK)

Matriks kacang polong ditimbang sebanyak 20 gram, kemudian dicampur dengan baku vitamin C masing-masing 5; 6; 7; mg dalam Erlenmeyer. Kemudian diekstraksi menggunakan larutan asam oksalat 4% sebanyak 25 mL dan dikocok selama 30 menit menggunakan *orbit shaker*. Ekstrak disaring dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100-mL. Sisa kacang polong tadi ditambahkan lagi 25 mL larutan asam oksalat 4% dan proses ekstraksi diulangi lagi, saring, dan masukkan ke dalam labu ukur lalu dicukupkan dengan air sampai 100 mL. Sebanyak 25 mL ekstrak diambil menggunakan pipet volume, dimasukkan dalam labu ukur 100-mL kemudian diikuti dengan penambahan 2 mL larutan 0,5% diklorofenol-indofenol dan didiamkan selama 5 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan thiourea sebanyak 10 mg untuk menghilangkan sisa dari reagen pengoksidasi. Lalu air ditambahkan sampai batas 100 mL.

Dari labu ukur 100-mL di atas, diambil 25 mL dimasukkan dalam Erlenmeyer lalu ditambahkan 4 mL cairan 2% 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam asam sulfat 70%. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam di *waterbath* kemudian segera didinginkan dengan *icebath* selama 10 menit. Senyawa hidrazon yang terbentuk diekstraksi dengan 3x6 mL etil asetat-asam asetat (98:2) dengan menggunakan corong pisah. Ekstrak kemudian dikumpulkan dan dicukupkan sampai 25 mL menggunakan labu ukur.

Larutan standar dibuat dengan konsentrasi 20 µg/mL. Masing-masing larutan sampel maupun standar ditotolkan pada lempeng KLTKT yang telah diaktifkan dengan cara dielusi dengan larutan metanol selama 1 jam diikuti dengan pemanasan 100°C selama 30 menit dengan volume penotolan 5 µL dan jarak penotolan 1 cm. Lempeng KLTKT kemudian dielusi dengan fase gerak terpilih. Setelah elusi selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis menggunakan TLC scanner pada panjang gelombang maksimum. Kadar vitamin C dalam sampel dihitung berdasarkan persamaan kurva kalibrasi yang telah diperoleh.

9. Identifikasi dan penetapan kadar asam askorbat dalam kacang polong dan ekstrak kacang polong(26,27,31)

Kacang polong yang akan diperiksa, ditimbang seksama 20,0 gram, dimasukkan dalam lumpang, dihancurkan, dan dicampur menggunakan larutan asam oksalat 4% sebanyak 25 mL. Setelah itu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dikocok selama 30 menit menggunakan *orbit shaker*. Ekstrak disaring dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100-mL. Sisa sampel tadi ditambahkan lagi 25 mL larutan asam oksalat 4% dan proses ekstraksi diulangi lagi, saring, dan masukkan ke dalam labu ukur lalu dicukupkan dengan air sampai 100 mL. Untuk ekstrak kacang polong ditimbang dan dicampur dengan

larutan asam oksalat 4% sebanyak 25 mL dalam Erlenmeyer dan dilakukan proses yang sama seperti pada kacang polong. Sebanyak 25 mL ekstrak diambil menggunakan pipet volume, dimasukkan dalam labu ukur 100-ml kemudian diikuti dengan penambahan 2 mL larutan 0,5 % diklorofenol-indofenol dan didiamkan selama 5 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan thiourea sebanyak 10 mg untuk menghilangkan sisa dari reagen pengoksidasi. Lalu air ditambahkan sampai batas 100 mL.

Dari labu ukur 100-mL di atas, diambil 25 mL dimasukkan dalam Erlenmeyer lalu ditambahkan 4 mL cairan 2% 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam asam sulfat 70%. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam di *waterbath* kemudian segera didinginkan dengan *icebath* selama 10 menit. Senyawa hidrazon yang terbentuk diekstraksi dengan 3x6 mL etil asetat-asam asetat (98:2) dengan menggunakan corong pisah. Ekstrak kemudian dikumpulkan dan dicukupkan sampai 25 mL menggunakan labu ukur.

Larutan standar dibuat dengan konsentrasi 20 µg/mL. Masing-masing larutan sampel maupun standar ditotolkan pada lempeng KLTKT yang telah diaktifkan dengan cara dielusi dengan larutan metanol selama 1 jam diikuti dengan pemanasan 100°C selama 30 menit dengan volume penotolan 5 µL dan jarak penotolan 1 cm. Lempeng KLTKT kemudian dielusi dengan fase gerak terpilih. Setelah

elusi selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis menggunakan TLC scanner pada panjang gelombang maksimum.

Identifikasi dilakukan dengan melihat adanya bercak berwarna orange pada KLTKT, membandingkan harga Rf sampel dengan standar, dan membandingkan spektrum serapan sampel dengan standar. Sedangkan kadar vitamin C dalam sampel dihitung berdasarkan persamaan kurva kalibrasi yang telah diperoleh.

10. Penetapan Kadar Air

Cawan kosong dikeringkan dalam oven selama 15 menit pada suhu 100-105°C. Kemudian cawan segera didinginkan dalam desikator dan ditimbang berat cawan kosong. Ditimbang secara cepat 5,0 gram kacang polong segar ke dalam cawan kosong tadi. Setelah itu dipanaskan cawan yang berisi sampel tadi selama 4-6 jam pada suhu 100-105°C. Cawan dikeluarkan dan didinginkan dalam desikator kemudian ditimbang. Cawan dipanaskan kembali dalam oven selama 30 menit, didinginkan dalam oven kemudian ditimbang. Pekerjaan ini dilakukan berulang kembali sampai berat konstan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pemilihan fase gerak yang sesuai

Digunakan tiga fase gerak terpilih yaitu kloroform-etil asetat (1:1), eter-etil asetat-asam asetat (75:25:4), dan etil asetat-heksan-asam asetat (50:40:10). Pada kondisi fase gerak pertama yaitu kloroform-etil asetat (1:1) dengan waktu penjuanan bejana ± 3 jam, jarak rambat elusi 8 cm dan volume penotolan 5 μL , diperoleh nilai R_f untuk senyawa hidrazon yaitu $\pm 0,45$. Sedangkan pada fase gerak kedua dan ketiga dengan melakukan kondisi yang sama tidak terjadi pemisahan. Data nilai R_f pada tiga macam kondisi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 2.

2. Pemilihan panjang gelombang maksimum menggunakan TLC Scanner

Dilakukan pengukuran pada daerah sinar tampak dengan panjang gelombang 400-600 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh untuk senyawa hidrazon adalah 505 nm. Spektrum serapan senyawa hidrazon dapat dilihat pada Gambar 7.

3. Pembuatan kurva kalibrasi

Diperoleh persamaan linier kurva kalibrasi yaitu $y = 1392,99 + 38,8x$ dengan nilai koefisien korelasi (r) adalah 0,9993. Kurva kalibrasi terdiri dari 6 konsentrasi dengan rentang 42-315 ng, dimana y adalah luas puncak dan x adalah berat standar. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3.

4. Uji linearitas

Linearitas dari kurva kalibrasi senyawa hidrazon ditunjukkan dari nilai koefisien korelasi (r) yaitu 0,9993 dan koefisien fungsi regresi yaitu 2,3%. Hasil yang diperoleh telah memenuhi kriteria persyaratan linearitas. Data dan gambar yang menunjukkan nilai linearitas dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 8.

5. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas deteksi (LOQ)

Hasil perhitungan secara statistik menggunakan persamaan kurva kalibrasi dengan rentang 42-315 ng, nilai LOD yang didapat adalah 12,52 ng, dan nilai LOQ adalah 41,72 ng. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.

6. Uji keterulangan

Uji keterulangan dilakukan dengan menotolkan masing-masing enam kali dari tiga konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Koefisien variasi pada konsentrasi rendah (120 ng) adalah 1,9%; pada konsentrasi sedang (240 ng) adalah 1,4%; dan pada konsentrasi tinggi (360 ng) adalah 1,4%. Dari percobaan uji keterulangan yang telah dilakukan untuk analisis ini hasil yang diperoleh sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.

7. Uji Perolehan Kembali (UPK)

Uji akurasi dilakukan melalui uji perolehan kembali (UPK). Uji ini dilakukan pada tiga konsentrasi yang berbeda-beda dengan kadar 80; 100; 120% dari kadar yang diperkirakan dan masing-masing konsentrasi dilakukan triplo. Pada penelitian ini, uji perolehan kembali dilakukan menggunakan metode simulasi. Nilai UPK dari tiga konsentrasi tersebut adalah $95,42\% \pm 1,63$ dengan nilai RSD (KV) sebesar 1,7%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6.

8. Identifikasi dan penetapan kadar asam askorbat dalam kacang polong dan ekstrak kacang polong.

Penetapan kadar pada penelitian ini digunakan 3 jenis sampel yaitu kacang polong *snap pea*, kacang polong *snow pea*, dan ekstrak kacang polong Actiwhite[®] yang diperoleh dari Cognis. Sebelum dilakukan penetapan kadar, dilakukan identifikasi terlebih dahulu dengan melihat adanya bercak berwarna orange, membandingkan harga Rf sampel dengan standar, dan membandingkan spektrum serapan. Hasilnya pada kedua sampel kacang polong terlihat adanya bercak sedangkan ekstrak kacang polong tidak terlihat. Sedangkan untuk identifikasi dengan melihat harga Rf, sampel dan standar memberikan harga Rf 0,45. Serapan sampel dan standar dapat dilihat pada Gambar 10.

Kadar rata-rata vitamin C yang diperoleh untuk kacang polong *snap pea* adalah 35,79 mg/100 g sedangkan kadar untuk kacang polong *snow pea* adalah 38,96 mg/100 g (Tabel 7a-b). Pada penentuan kadar vitamin C dalam ekstrak kacang polong Actiwhite[®] digunakan cara adisi karena memberikan luas puncak yang sangat kecil. Luas puncak yang sangat kecil ini tidak dapat ditentukan menggunakan kurva kalibrasi yang digunakan (Gambar 9c). Cara adisi digunakan untuk memberikan luas puncak pada daerah kurva kalibrasi sehingga memungkinkan untuk dilakukan penentuan kadar vitamin C (Gambar 9d). Konsentrasi

vitamin C dalam ekstrak kacang polong Actiwhite[®] yang didapat dengan menggunakan cara adisi ini yaitu 7,23 µg/g (Tabel 8 dan Tabel 9).

Untuk penetapan kadar air, didapatkan hasil berturut-turut 83,75% dan 85,07% untuk kacang polong *snap pea* dan kacang polong *snow pea*. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 10.

B. PEMBAHASAN

Optimasi kondisi analisis dimulai dengan penentuan fase gerak yang sesuai. Fase gerak yang diuji terdiri dari kloroform-etil asetat (1:1), eter-etil asetat-asam asetat (75:25:4), dan etil asetat-heksan-asam asetat (50:40:10). Lempeng yang digunakan adalah lempeng KLTKT silika gel 60 F₂₅₄. Sebelum digunakan lempeng KLTKT diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan pada suhu 100^oC selama 30 menit setelah sebelumnya dielusi menggunakan metanol selama 1 jam untuk membersihkan lempeng dari pengotor yang ada.

Larutan baku vitamin C dibuat dengan konsentrasi 200 ppm, lalu sebanyak 10 mL diambil, dimasukkan dalam labu ukur 100-mL. Sebanyak 25 mL larutan asam oksalat 4% ditambahkan kemudian diikuti dengan penambahan 2 mL larutan 0,5 % diklorofenol-indofenol. Penambahan diklorofenol-indofenol dimaksudkan untuk mengoksidasi vitamin C menjadi asam dehidroaskorbat. Oksidasi vitamin C selesai dalam waktu 5 menit pada suhu kamar, kemudian ditambahkan thiourea sebanyak 10 mg

untuk menghilangkan sisa reagen pengoksidasi. Lalu air ditambahkan sampai batas 100 mL.

Dari labu ukur 100-mL, diambil 25 mL larutan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer lalu ditambahkan 4 mL cairan 2% 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam asam sulfat 70%. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam di *waterbath* kemudian segera didinginkan dengan *icebath* selama 10 menit. Larutan 2% 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam asam sulfat 70% dimaksudkan untuk membentuk suatu senyawa hidrazon (pengaruh lama inkubasi pada pembentukan senyawa bis 2,4-dinitrofenilhidrazon dapat dilihat pada Tabel 1). Vitamin C yang telah dioksidasi menjadi asam dehidroaskorbat *dicoupling* dengan Larutan 2% 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam asam sulfat 70% menjadi bis-2,4-dinitrofenilhidrazon yang berwarna orange.

Senyawa hidrazon yang terbentuk diekstraksi dengan 3x6 mL etil asetat-asam asetat (98:2) dengan menggunakan corong pisah. Ekstrak kemudian dikumpulkan dan dicukupkan sampai 25 mL menggunakan labu ukur.

Larutan senyawa hidrazon kemudian ditotolkan pada lempeng KLTKT dengan volume penotolan 5 μ L. Lempeng dielusi dalam bejana KLT yang telah dijenuhkan selama \pm 3 jam dengan volume eluen total 10 mL. Tujuan dari penjenuhan ini adalah agar naiknya eluen pada lempeng selama elusi rata. Lempeng yang telah selesai dielusi dan dikeringkan,

kemudian dianalisis menggunakan TLC scanner. Pengukuran dilakukan pada daerah sinar tampak. Pada densitogram hasil analisis, diperoleh data *max position* yang merupakan nilai Rf pada puncak densitogram. Fase gerak yang dipilih untuk analisis adalah kombinasi kloroform-etilasetat (1:1) karena memberikan nilai Rf $\pm 0,45$ sedangkan fase gerak yang lain tidak terjadi pemisahan (Tabel 2).

Bercak senyawa hidrazon yang telah dielusi dengan fase gerak terpilih dianalisis dengan TLC scanner pada daerah sinar tampak 400-600 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh untuk senyawa hidrazon yaitu 505 nm (Gambar 7).

Setelah kondisi optimum untuk analisis diperoleh, selanjutnya dilakukan validasi metode analisis. Validasi diperlukan untuk menjamin metode KLTKT densitometri dapat digunakan untuk analisis vitamin C dalam kacang polong. Parameter validasi yang diukur adalah linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi, dan uji perolehan kembali (akurasi).

Tahap pertama yang dilakukan untuk validasi metode analisis adalah membuat kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi terdiri dari enam konsentrasi dengan rentang 42-315 ng. Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh adalah $y = 1392,99 + 38,8x$. Linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi dapat ditentukan dari hasil kurva kalibrasi (Tabel 3).

Uji linearitas dilakukan untuk mendapatkan batas deteksi dan batas kuantitasi. Nilai koefisien korelasi (r) yang didapatkan dari kurva kalibrasi

adalah 0,9993 dengan koefisien fungsi regresi (V_{x0}) adalah 2,3%. Batas deteksi untuk asam askorbat adalah 12,52 ng, sedangkan batas kuantitasnya adalah 41,72 ng (Tabel 4).

Uji presisi dilakukan dengan menguji keterulangan metode analisis. Uji keterulangan dilakukan pada konsentrasi rendah (120 ng), sedang (240 ng) dan tinggi (360 ng), dengan jumlah penotolan enam kali dari masing-masing konsentrasi. Hasil dari uji keterulangan telah memenuhi persyaratan yaitu nilai koefisien variasi di bawah 2% (Tabel 5).

Uji akurasi dilakukan melalui uji perolehan kembali (UPK). Pada percobaan uji perolehan kembali, digunakan tiga konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi rendah, sedang dan tinggi. Uji perolehan kembali dilakukan untuk mengetahui keakuratan dan kepresisian metode yang dilakukan. Hasil dianggap baik bila berada dalam rentang 90-110% dengan koefisien variasi $< 2\%$. Dalam penelitian ini, uji perolehan kembali dilakukan menggunakan metode simulasi. Nilai UPK rata-rata dari tiga konsentrasi adalah $95,42\% \pm 1,63$ dengan nilai RSD (KV) sebesar 1,7% (Tabel 6).

Sampel yang digunakan ada 3 macam yaitu kacang polong *snap pea* dan kacang polong *snow pea* yang diperoleh dari salah satu supermarket yang ada di Depok, dan ekstrak kacang polong Actiwhite[®] yang diperoleh dari Cognis. Analisis pertama kali dilakukan terhadap sampel yaitu identifikasi dengan melihat adanya bercak berwarna orange (Gambar 5),

nilai Rf yang dibandingkan dengan standar, dan membandingkan spektrum serapan sampel dengan standar menggunakan TLC scanner. Perbandingan spektrum serapan sampel dan standar dapat dilihat pada Gambar 10.

Kadar vitamin C rata-rata yang diperoleh untuk kacang polong *snap pea* adalah 35,79 mg/100 g sedangkan kadar untuk kacang polong *snow pea* adalah 38,96 mg/100 g (Tabel 7a-b). Pada penentuan kadar vitamin C dalam ekstrak kacang polong Actiwhite[®] digunakan cara adisi yaitu dengan penambahan sejumlah standar vitamin C. Cara ini digunakan karena vitamin C dalam ekstrak kacang polong Actiwhite[®] memberikan luas puncak yang sangat kecil (Gambar 9c). Luas puncak yang sangat kecil ini tidak dapat ditentukan menggunakan kurva kalibrasi yang digunakan. Cara adisi digunakan untuk memberikan luas puncak pada daerah kurva kalibrasi sehingga memungkinkan untuk dilakukan penentuan kadar vitamin C (Gambar 9d). Konsentrasi vitamin C dalam ekstrak kacang polong Actiwhite[®] yang didapat dengan menggunakan cara adisi ini yaitu 7,23 µg/g (Tabel 8 dan Tabel 9).

Untuk penetapan kadar air, didapatkan hasil berturut-turut 83,75% dan 85,07% untuk kacang polong *snap pea* dan kacang polong *snow pea* (Tabel 10).

BAB V

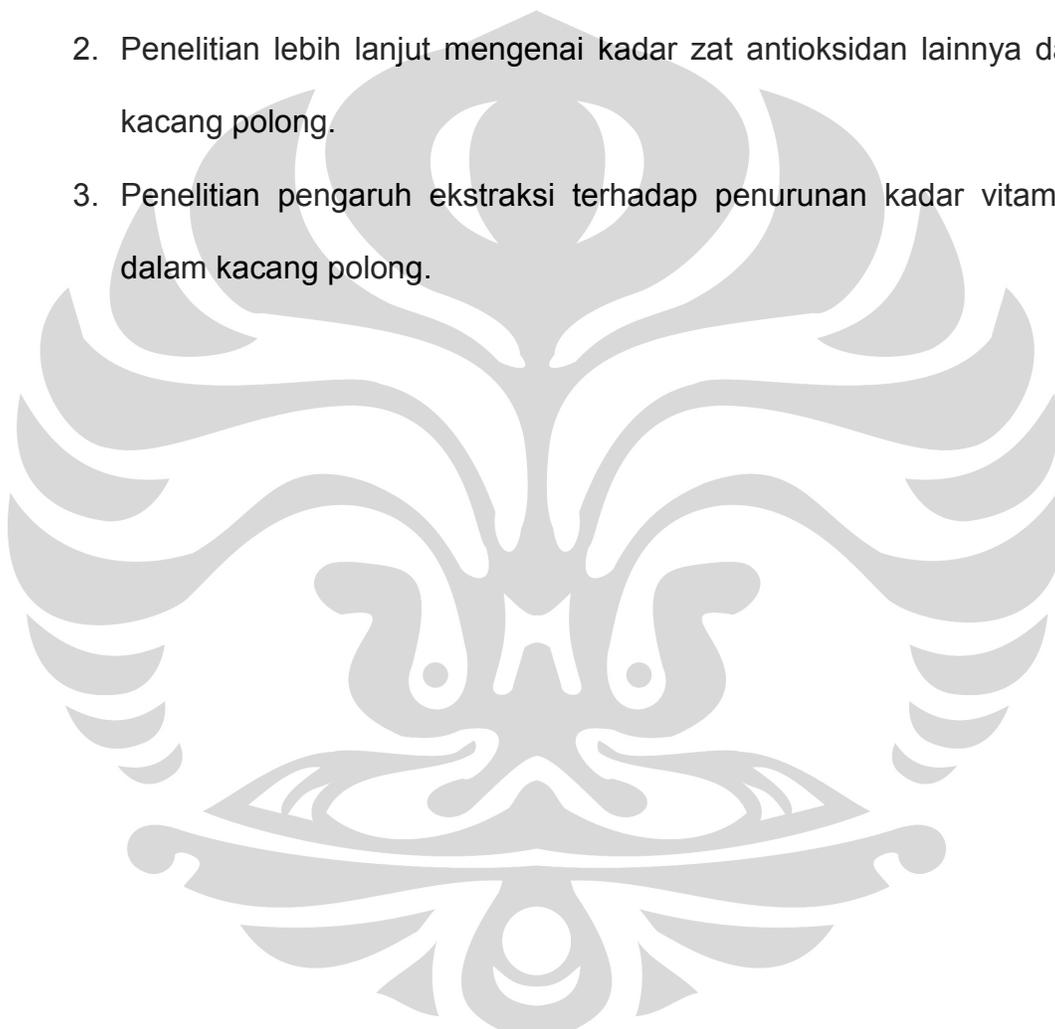
KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Kondisi analisis optimum pada penelitian ini menggunakan fase gerak campuran kloroform-etil asetat (1:1), fase diam lempeng KLTKT silika gel 60 F₂₅₄, pada panjang gelombang 505 nm, dengan R_f ± 0,45.
2. Metode KLTKT densitometri dapat digunakan untuk analisis vitamin C dalam kacang polong dengan validitas yang baik, yaitu koefisien variasi kurang dari 2%; akurasi 95,42% ±1,63. Kurva kalibrasi menghasilkan linearitas 0,9993, batas deteksi (LOD) 12,52 ng, dan batas kuantitasi (LOQ) 41,72 ng.
3. Kadar rata-rata vitamin C yang diperoleh untuk kacang polong *snap pea* adalah 35,79 mg/100 g sedangkan kadar untuk kacang polong *snow pea* adalah 38,96 mg/100 g dengan kadar air berturut-turut 83,75% dan 85,07%. Sedangkan konsentrasi vitamin C pada ekstrak kacang polong Actiwhite[®] yaitu 7,23 µg/g.

B. SARAN

1. Untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat sebaiknya digunakan peralatan yang memiliki sensitivitas yang lebih tinggi seperti Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).
2. Penelitian lebih lanjut mengenai kadar zat antioksidan lainnya dalam kacang polong.
3. Penelitian pengaruh ekstraksi terhadap penurunan kadar vitamin C dalam kacang polong.



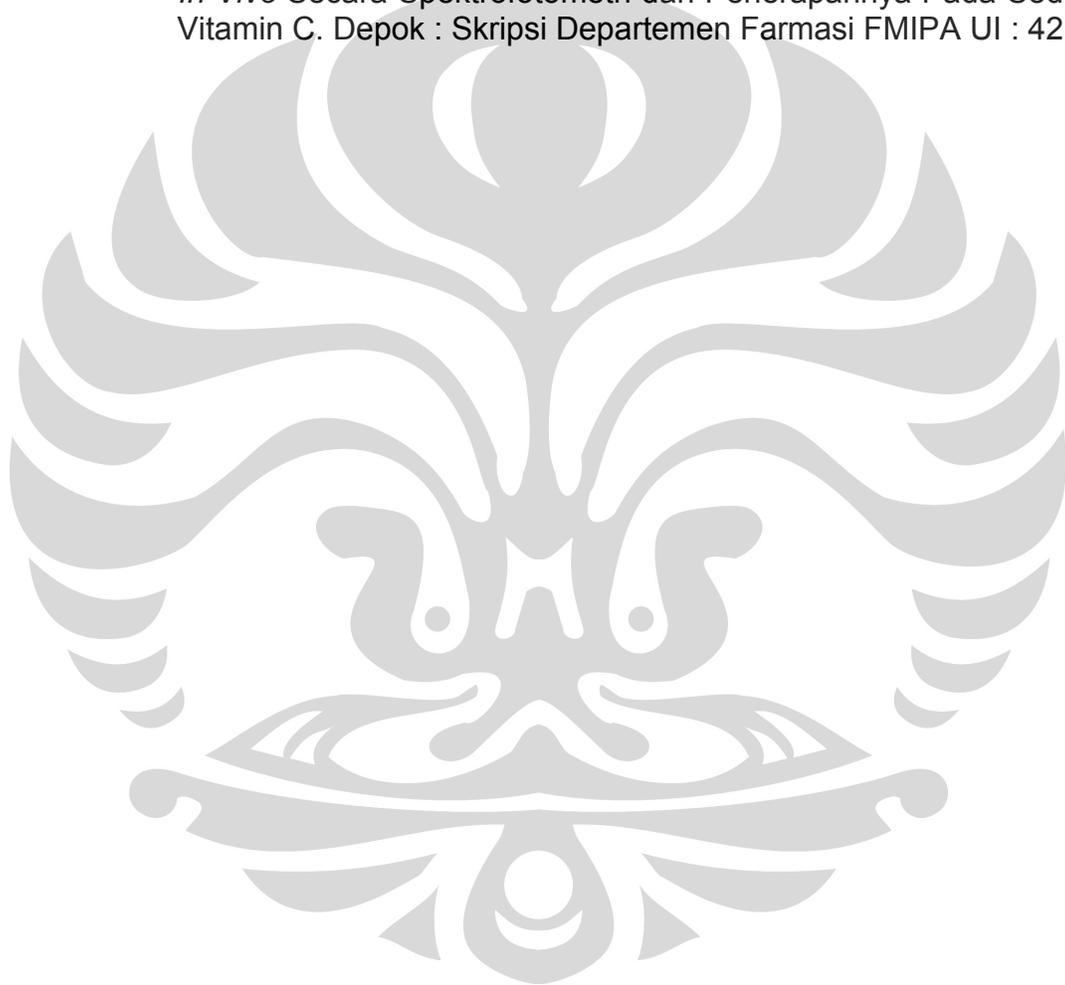
DAFTAR ACUAN

1. Anonim. *Pisum sativum* L. (<http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/>), 26 Desember 2009, pkl 22.16.
2. Shahidi, Fereidoon. *Natural Antioksidants Chemistry, Health Effects, and Applications*. USA : AOCS press, 1997 : 53-54
3. Machlin, Lawrence J. *Handbook of Vitamins, 2nd edition, Revised & Expanded*. New York : Marcell Dekker, Inc, 1991.
4. Arief, Sjamsul. *Radikal Bebas*. FK Unair/RSU Dr. Soetomo, Surabaya (<http://www.pediatrik.com/buletin/>), 24 Agustus 2009, pkl 20.07.
5. Anonim. *Mekanisme Kerja Antioksidan* (<http://www.naturindonesia.com/>), 23 Agustus 2009, pkl 21.45.
6. Meisenber, G., Simmons., W.H. *Principles of Medical Biochemistry 2nd Edition*. Philadelphia : Mosby Elsevier, 533-534
7. Albuquerque, Barbara, F. C. Lidon & A. E. Leitao. Ascorbic Acid Quantification in Melon Samples-The Importance of the Extraction Medium for HPLC Analysis. *Plant Phy.* **31** (3-4), 2005 : 247-251.
8. Roomi, M.W & C.S Tsao. Thin Layer Chromatographic Separation of Isomers of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid as Sodium Borate Complexes on Silica Gel and Cellulose Plate. *J. Agric. Food Chem.* **46**,1998 : 1406-1409.
9. Christian, Steve. *Pisum sativum* (http://www.floridata.com/ref/p/pisu_sat.cfm), 26 Desember 2009, pkl 22.06.

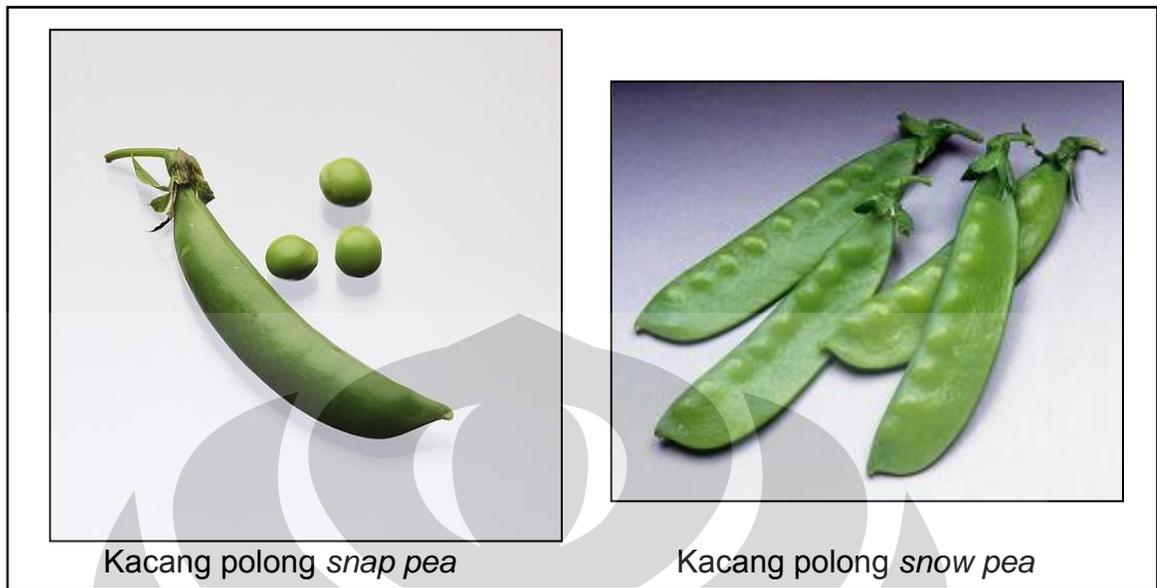
10. Nilsson, Jessica. Total Antioxidant Capacity in Different Pea (*Pisum sativum*) Varieties After Blanching and Freezing. *Food Chemistry* **86**, 2004) : 501-507
11. Anonim. *Farmakope Indonesia III*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979 : 47.
12. Anonim. *The Pharmaceutical Codex, 11th edition*. London : The Pharmaceutical Press, 1979 : 61 – 62.
13. Eschleman, M. *Introductory Nutrition and Diet Therapy*. USA : Lippincott, 1984: 155-157
14. Zetler, G., Seidel, G., Siegers, C.P., Iven, H. Pharmacokinetics of Ascorbic Acid in Man. *J. Clin. Pharmacol.*, 10, 1976: 273-282
15. Tjay, Tan Hoan. *Obat-obat Penting Ed ke-5*. Jakarta : PT Elex Media Komputindo, 2002 : 807-809.
16. Anonim. *Farmakope Indonesia IV*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995 : 1002.
17. Johnson, Edward L, Robert Stevenson. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Alih bahasa Kosasih Padmawinata Bandung : Penerbit ITB.
18. Bernard Fried, Joseph Sherma. *Practical Thin Layer Chromatography, A Multidisciplinary Approach*. USA : CRC Press, 1996 : 1 – 15.
19. Touchstontou, Joseph C, Murrell F. Dobbins. 1983. *Practice of Thin Layer Chromatography 2nd edition*. USA : Joh Wiley & Sons, Inc.
20. Harmita. 2006. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok : Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

21. Gruenwede, Dieter W, John R Whitaker. 1987. *Food Analysis, Principles and Techniques Volume 4 Separation Techniques*. USA : Marcell Dekker, Inc.
22. Deinstrop, Elke Hahn. 2007. *Applied Thin Layer Chromatography 2nd edition*. Jerman : Wiley – VCH.
23. Kovar dan Morlock. 1996. Detection, Identification, and Documentation. Dalam : Sherma J dan Fried B. *Handbook of Thin Layer Chromatography 2nd Edition*, Revised and Expanded, vol 71, Chapter 29. New York : Marcel Dekker, Inc.
24. Anonim. 1986. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Post-mortem Material 2nd Edition*. London : The Pharmaceutical Press.
25. Harmita. 2006. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Depok : Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
26. Anonim. Quantitative determination of vitamin C in fruit juice (A-10.5). Camag Laboratory (<http://www.camag.com/>), 20 Agustus 2009, pkl 21.09.
27. Vega H., Mario, et al. *HPTLC As Tool For Quality Control In Salmon Culture : Evaluation of nutritive quality in Salmon feed*. University of Concepcion, Faculty of Pharmacy (www.hptlc.com/berlin/2006pdf/), 20 Agustus 2009, pkl 22.23.
28. Laboratoires Serobiologiques. *Proteasyl[®]TP Botanical Anti-Enzyme Complex For Firmness and Elasticity*. Cognis France S.A, France
29. Laboratoires Serobiologiques. 2008. *Actiwhite[®]LS 9808 provisional*. Cognis Ecohybrids, Division de Cognis France, France.

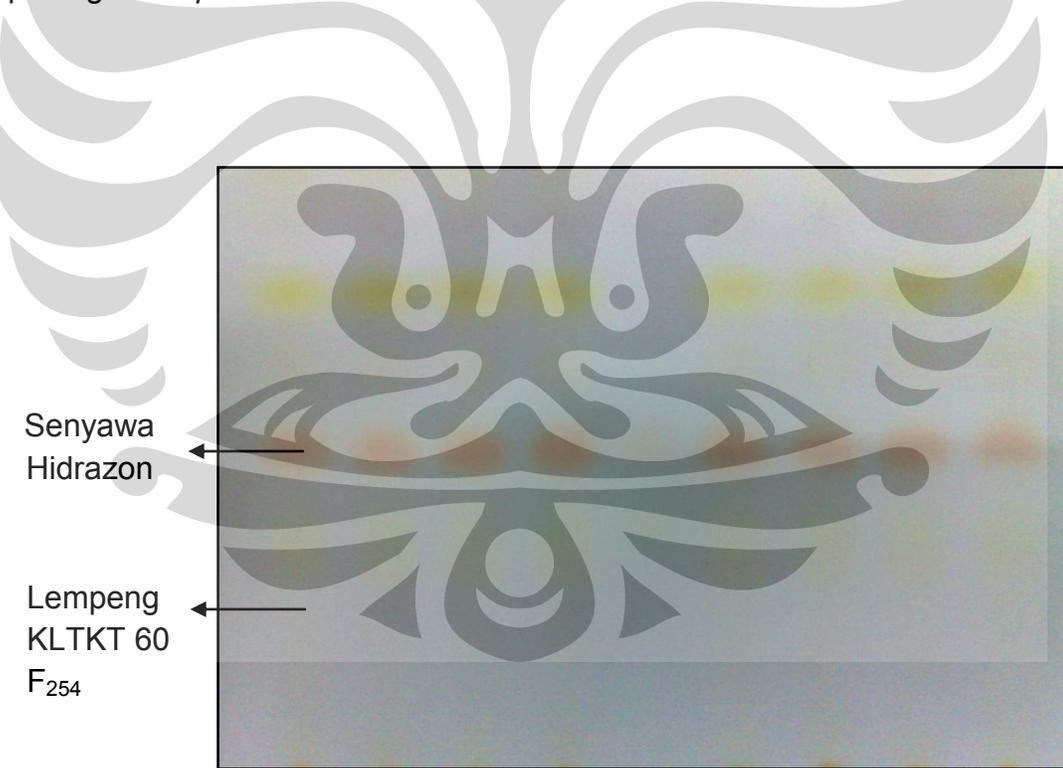
30. Begoun, Paula. *Vitamin C*. (<http://www.cosmeticscop.com/>), 28 Agustus 2009, pkl 00.15.
31. Freed, Myer. 1966. *Methods of Vitamin Assay Third Edition*. New York : Interscience Publishers.
32. Gones, Vania. 2009. Metode Analisis Vitamin C Dalam Urin *In Vitro* dan *In Vivo* Secara Spektrofotometri dan Penerapannya Pada Sediaan Vitamin C. Depok : Skripsi Departemen Farmasi FMIPA UI : 42.



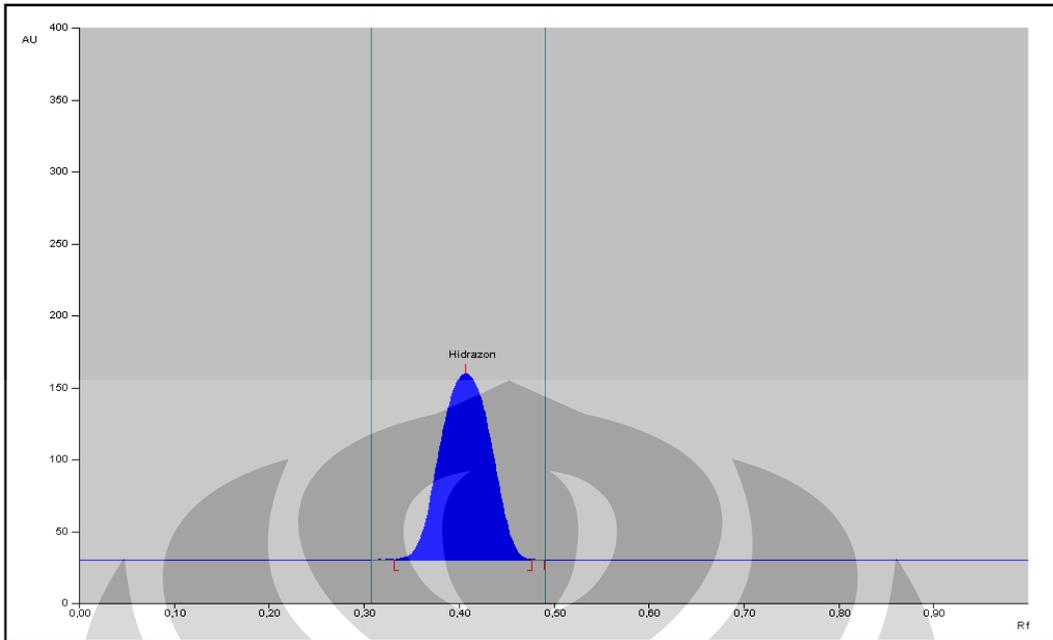




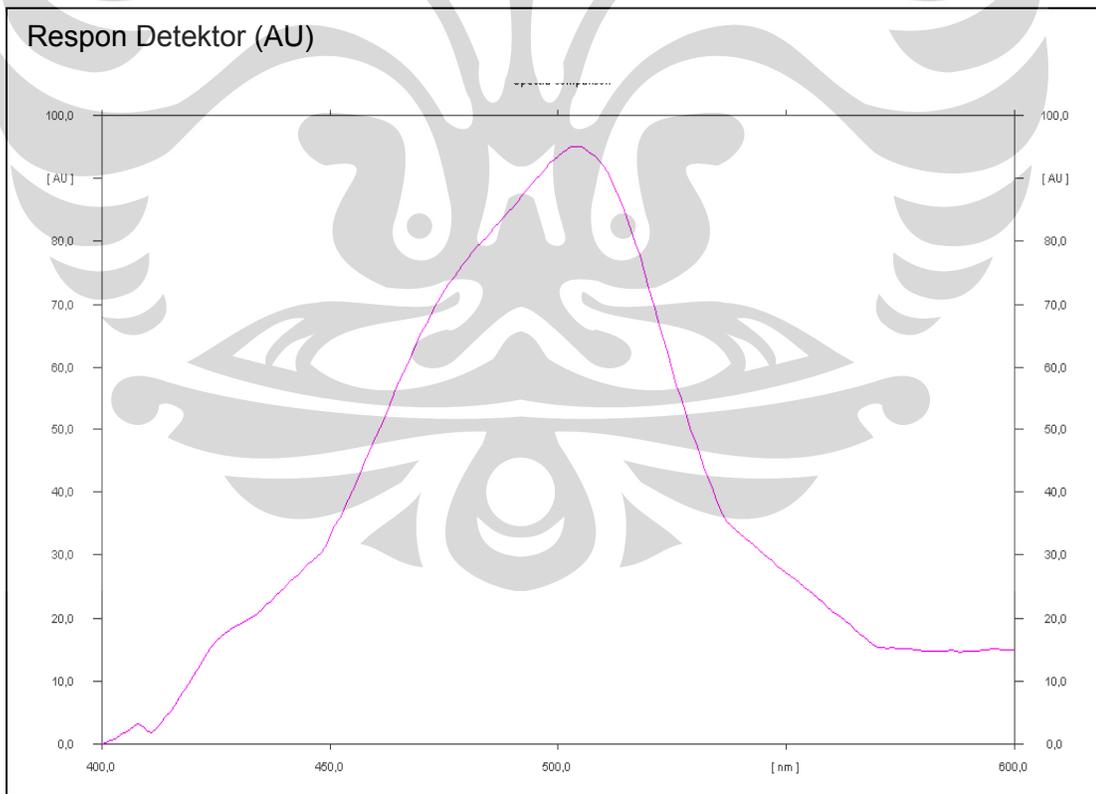
Gambar 4. Perbedaan bentuk antara kacang polong *snap pea* dan kacang polong *snow pea*.



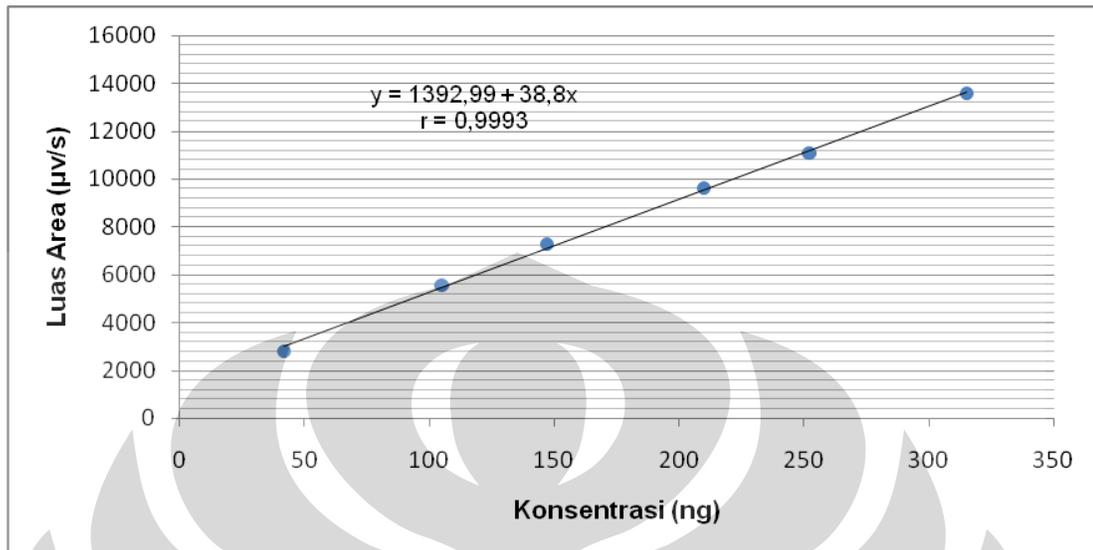
Gambar 5. Asam askorbat dari sampel kacang polong *snap pea* yang direaksikan dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin menghasilkan bercak berwarna orange.



Gambar 6. Densitogram senyawa hidrazon 20 ppm dengan volume penotolan 5 μ L

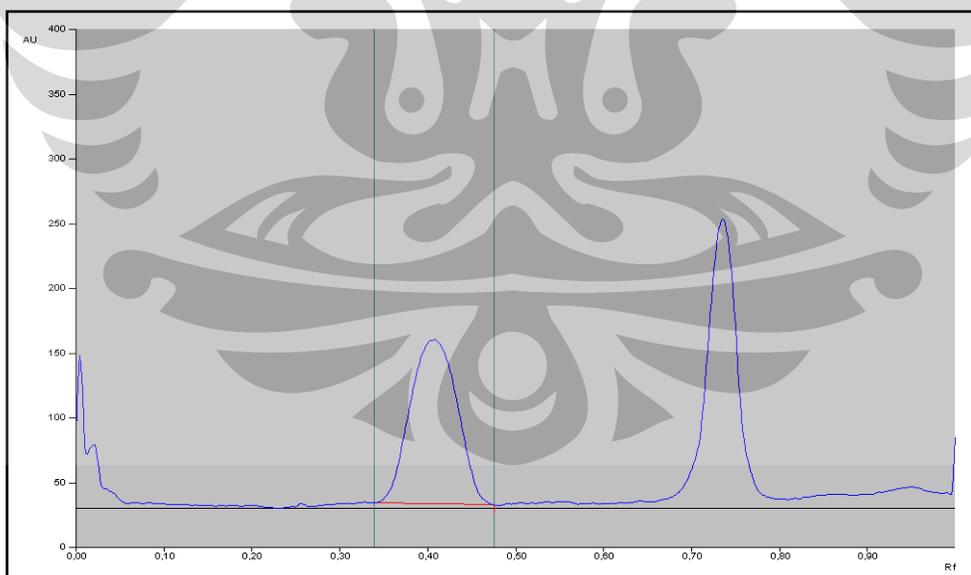


Gambar 7. Spektrum serapan senyawa hidrazon



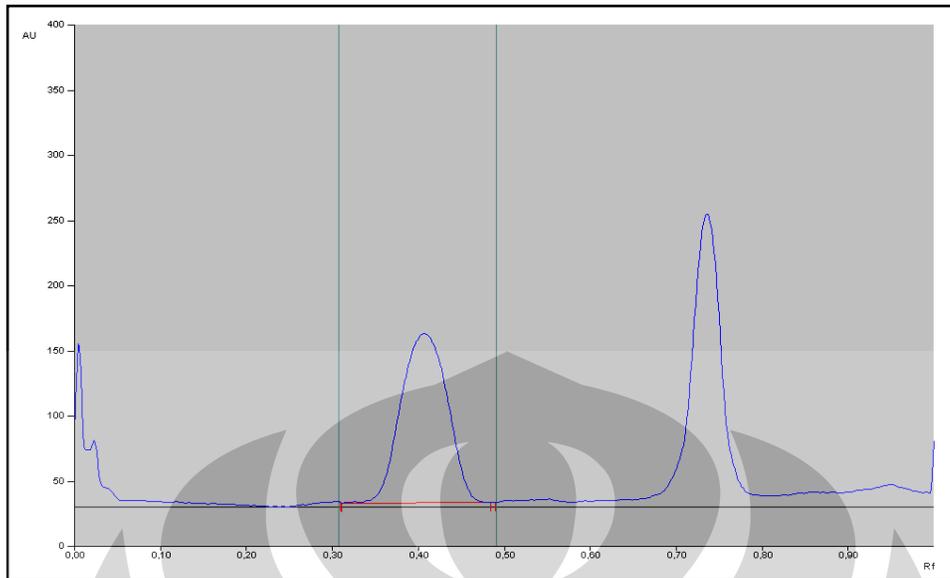
Gambar 8. Kurva kalibrasi senyawa hidrazon

Kondisi : Panjang gelombang 505 nm; fase gerak kloroform-etil asetat (1:1); konsentrasi larutan 21 ppm; volume penotolan 5 µL



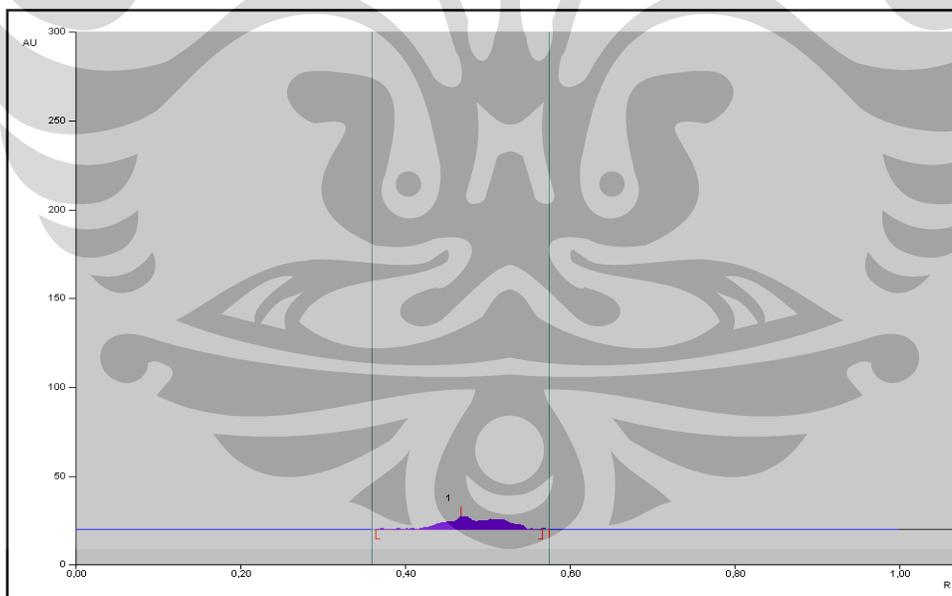
Gambar 9a. Densitogram senyawa hidrazon sampel kacang polong *snap pea*

Kondisi : Panjang gelombang 505 nm; fase gerak kloroform-etil asetat (1:1)



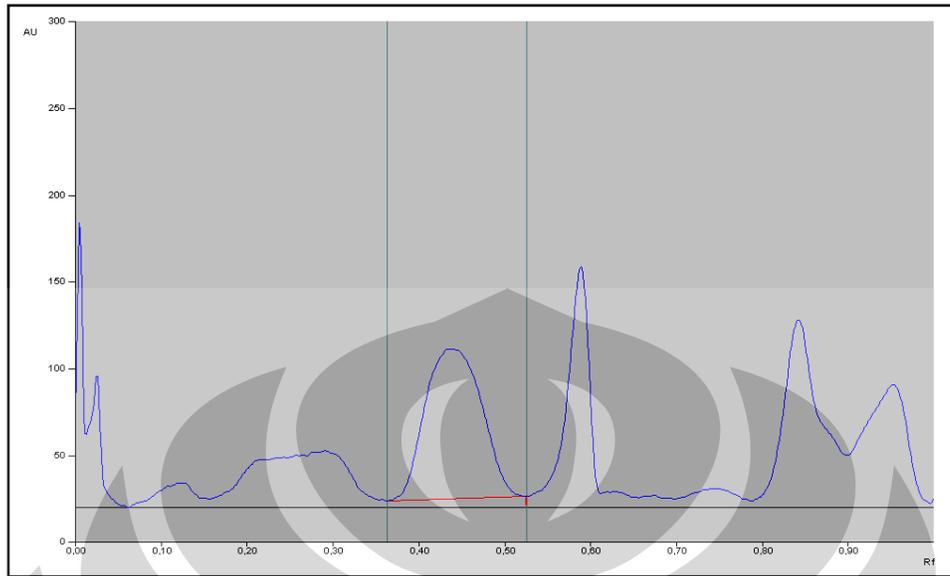
Gambar 9b. Densitogram senyawa hidrazon sampel kacang polong *snow pea*

Kondisi : Panjang gelombang 505 nm; fase gerak kloroform-etil asetat (1:1)



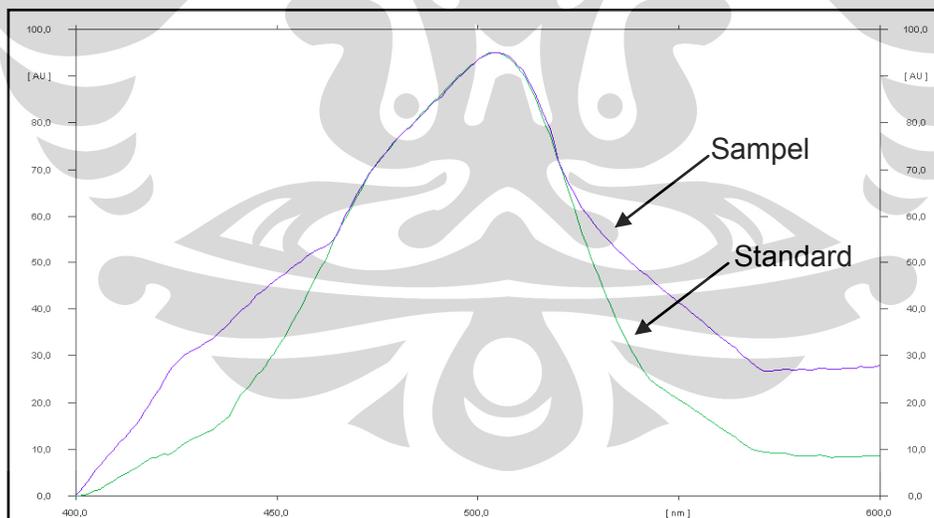
Gambar 9c. Densitogram senyawa hidrazon sampel ekstrak kacang polong Actiwhite®

Kondisi : Panjang gelombang 505 nm; fase gerak kloroform-etil asetat (1:1)



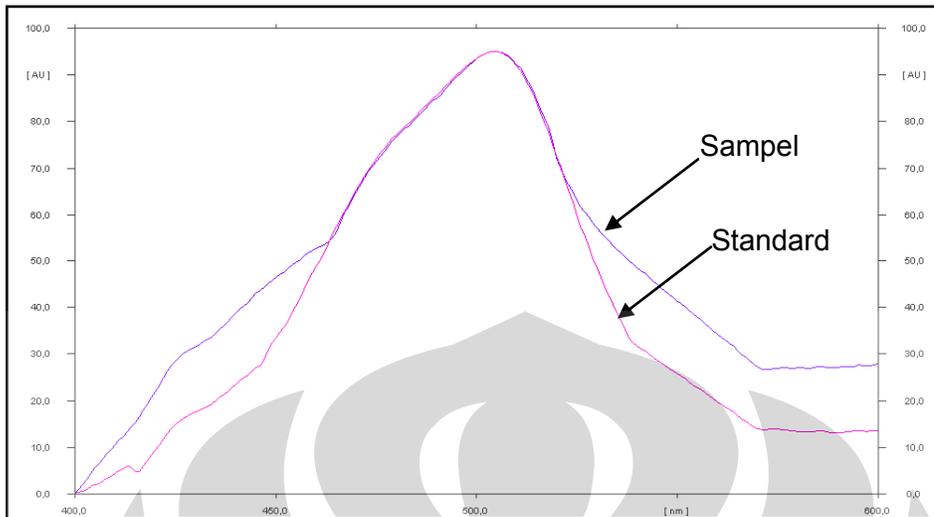
Gambar 9d. Densitogram senyawa hidrazon sampel ekstrak kacang polong Actiwhite[®] yang diadisi dengan vitamin C baku.

Kondisi : Panjang gelombang 505 nm, fase gerak kloroform-etil asetat (1:1)



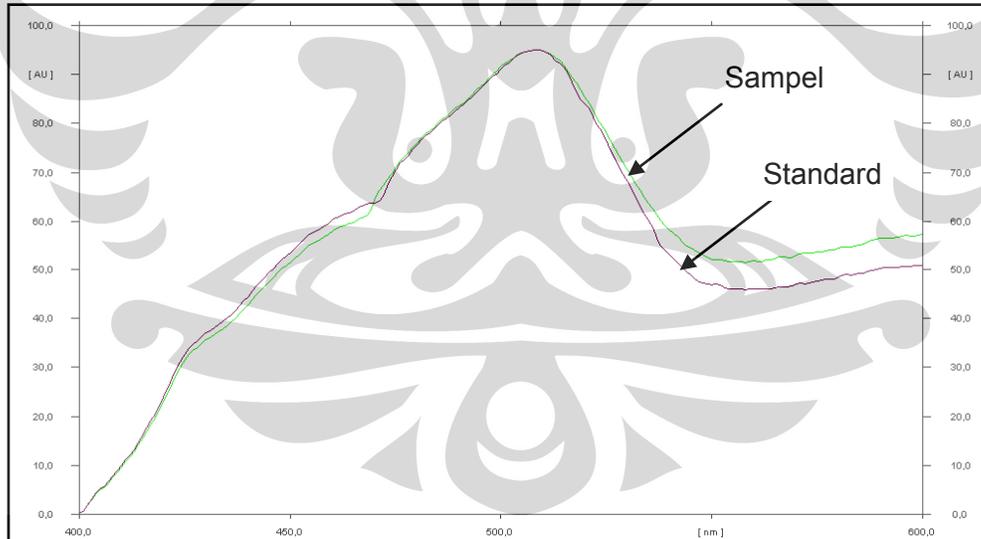
Gambar 10a. Spektrum serapan senyawa hidrazon standard dengan sampel kacang polong *snap pea*

Kondisi : Panjang gelombang 505 nm, fase gerak kloroform-etil asetat (1:1)



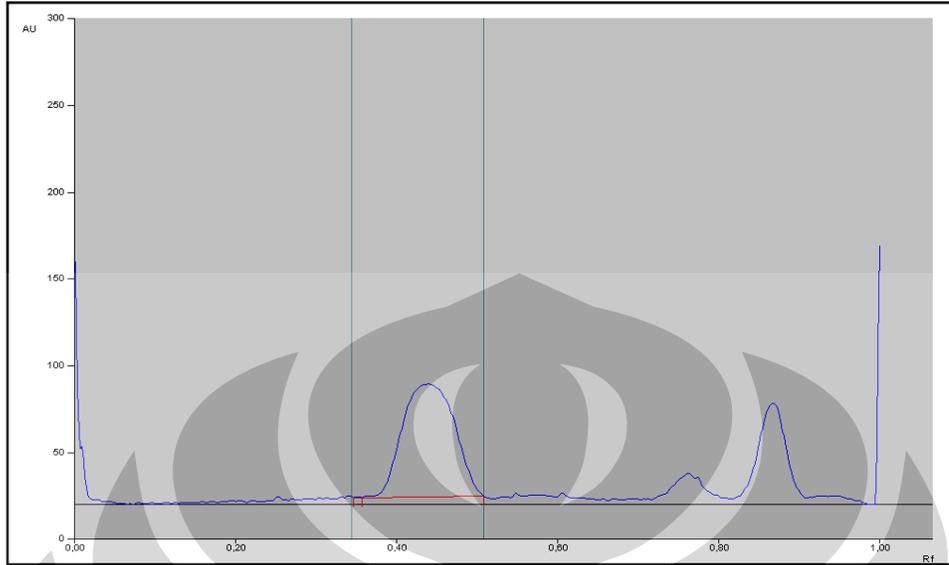
Gambar 10b. Spektrum serapan senyawa hidrazon standar dengan sampel kacang polong *snow pea*

Kondisi : Panjang gelombang 505 nm, fase gerak kloroform-etil asetat (1:1)

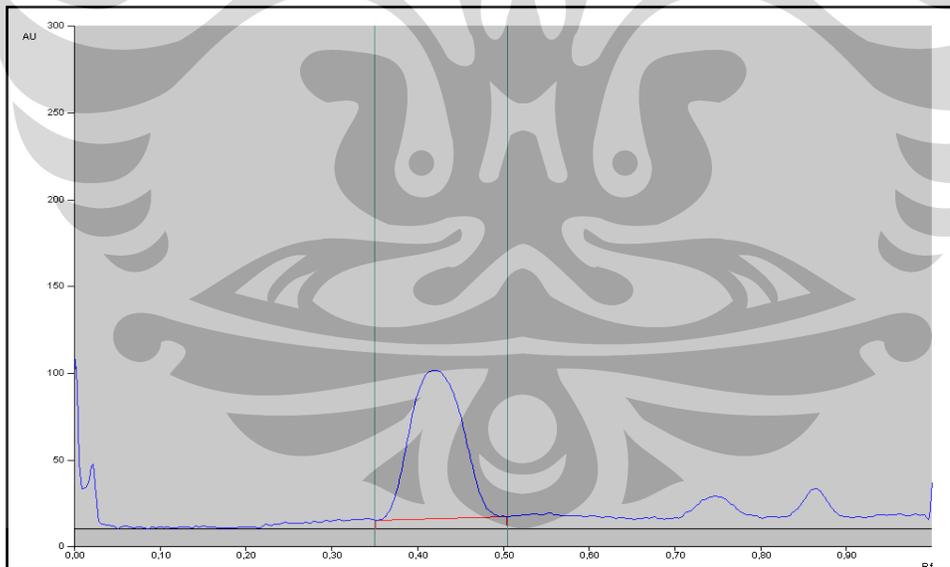


Gambar 10c. Spektrum serapan senyawa hidrazon standar dengan sampel ekstrak kacang polong Actiwhite®

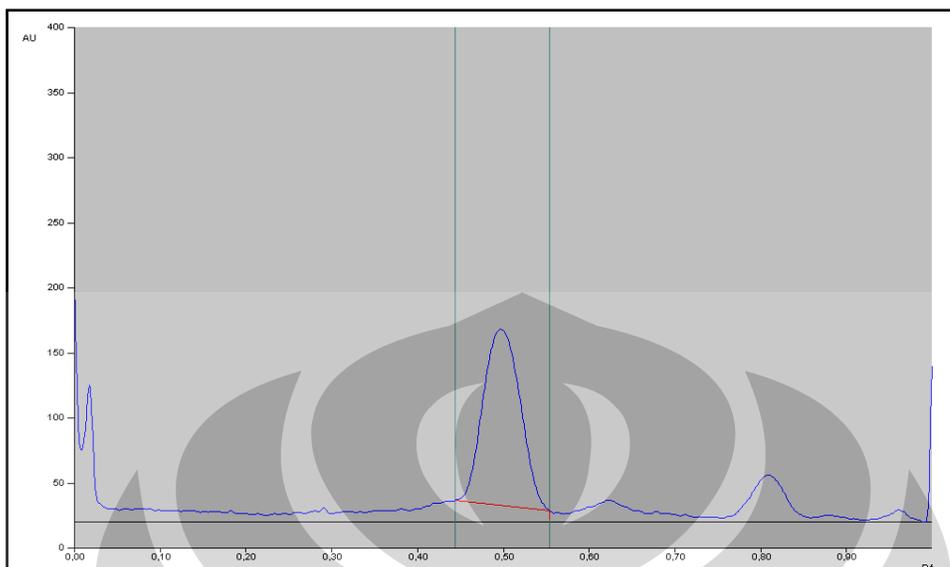
Kondisi : Panjang gelombang 505 nm, fase gerak kloroform-etil asetat (1:1)



Gambar 11a. Densitogram uji perolehan kembali senyawa hidrazon pada konsentrasi rendah



Gambar 11b. Densitogram uji perolehan kembali senyawa hidrazon pada konsentrasi sedang



Gambar 11c. Densitogram uji perolehan kembali senyawa hidrazon pada konsentrasi tinggi



Gambar 12. Alat TLC scanner 3 (Camag) beserta komputer yang dilengkapi program winCATS



Tabel 1

Pengaruh Lama Inkubasi Pada Pembentukan Senyawa Hidrazon

Waktu (Jam)	Luas Puncak [y]
1	1552,3
2	2509,0
3	4246,2
4	4233,2

Tabel 2

Nilai Rf Senyawa Hidrazon Pada Variasi Fase Gerak

No	Fase Gerak	Nilai Rf
1.	Kloroform - etil asetat (1:1)	0,45
2.	Eter - etil asetat - asam asetat (75:25:4)	Tidak terjadi pemisahan
3.	Etil asetat – heksan – asam asetat (50:40:10)	Tidak terjadi pemisahan

Keterangan : Fase diam kromatografi lapis tipis kinerja tinggi densitometri
60 F₂₅₄

Tabel 3

Kurva Kalibrasi Senyawa Hidrazon

Berat (ng) [x]	Luas Puncak [y]
42	2822,9
105	5571,5
147	7284,3
210	9614,3
252	11073,0
315	13552,5

Persamaan garis linier :

$$y = 1392,99 + 38,8x$$

$$r = 0,9993$$

Koefisien fungsi regresi (V_{xo}) = 2,3%

Tabel 4

Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Berat (ng) [x]	Luas area [y]	Luas area sebenarnya [yi]	$(y - y_i)^2$
42	2822,9	3022,6	39876,01
105	5571,5	5466,99	10992,34
147	7284,3	7096,59	35235,04
210	9614,3	9540,99	5374,36
252	11073,0	11170,59	9523,81
315	13552,5	13614,99	3905
			$\Sigma = 104836,56$

Keterangan :

y_i = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

$S(y/x) = 161,892$

LOD = 12,52 ng

LOQ = 41,72 ng

Tabel 5
Uji Keterulangan

Berat (ng)	Luas Puncak [y]	[xi]	xi rata-rata	SD	KV (%)
120	5845,8	114,76	115,08	2,21	1,9
	5711,7	111,31			
	5841,7	114,66			
	5869,9	115,38			
	5914,8	116,54			
	5965,7	117,85			
240	10107,9	224,61	221,325	3,17	1,4
	9986,0	221,47			
	9896,7	219,17			
	9896,7	219,17			
	9847,4	217,9			
	10147,4	225,63			
360	14083,8	327,08	325,905	4,697	1,4
	13818,9	320,26			
	14173,5	329,4			
	13990,0	324,66			
	13857,5	321,5			
	14295,0	332,53			

Keterangan :

xi = Berat berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Tabel 6

Uji Perolehan Kembali

Berat standar (mg)	Standar yang ditotolkan (ng) [x]	Luas Puncak [y]	x'	UPK (%)	UPK rata-rata (%)	RSD (%)
5,0	62,5	3728,4	60,19	96,30	95,42 ± 1,63	1,7
		3644,2	58,02	92,83		
		3678,8	58,91	94,26		
6,0	75	4205,8	72,5	96,67		
		4133,6	70,63	93,55		
		4222,8	72,93	96,6		
7,3	91,25	4752,6	86,59	94,89		
		4817,4	88,26	96,72		
		4842,2	88,9	97,42		

Keterangan :

x' = Berat standar hasil analisis

y = Luas puncak yang didapat dari hasil percobaan

Tabel 7a

Penetapan Kadar Vitamin C dalam Kacang Polong *Snap Pea*

Berat Sampel (g)	Luas Puncak [y]	Kadar (mg/100 g)	Kadar rata-rata (mg/100 g)	KV (%)
	5121,4	36,45		
	5102,4	36,27		
22,10	4973,4	35,01	35,79	1,96
	4967,0	34,94	$\pm 0,7007$	
	5120,6	36,45		
	5038,0	35,64		

Tabel 7b
 Penetapan Kadar Vitamin C dalam Kacang Polong *Snow Pea*

Berat Sampel (g)	Luas Puncak [y]	Kadar (mg/100 g)	Kadar rata-rata (mg/100 g)	KV (%)
20,498	5049,2	38,54	38,96 ± 0,3379	0,87
	5092,6	39,00		
	5115,0	39,24		
	5049,2	38,54		
	5103,3	39,11		
	5120,6	39,30		

Tabel 8

Penetapan Kadar Sampel Ekstrak Kacang Polong Actiwhite[®] + Standar Vitamin C Untuk Menentukan Kadar vitamin C Sebenarnya dalam Ekstrak Kacang Polong Actiwhite[®]

Berat sampel (g)	Luas puncak sampel + standar asam askorbat	Luas puncak sampel + standar asam askorbat rata-rata	KV (%)	Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi rata-rata (%)	KV (%)
23,9618	4568,7	4582,93 ± 17,7966	0,39	32,7393	32,8860 ± 0,1835	0,56
	4602,9			33,0919		
	4595,4			33,0145		
	4598,6			33,0475		
	4564,0			32,6908		
	4568,0			32,7321		

Tabel 9

Penetapan Kadar Vitamin C dalam Ekstrak Kacang Polong Actiwhite®

Berat Sampel (g)	Luas Puncak [y]	Kadar ($\mu\text{g/g}$)	Kadari rata-rata ($\mu\text{g/g}$)	KV (%)
23,9618	337,4	7,26	7,23 $\pm 0,2790$	3,8
	337,6	7,26		
	406,8	6,81		
	346,3	7,45		
	352,5	7,58		
	326,6	7,03		

Tabel 10

Penetapan Kadar Air Pada Kacang Polong *Snap Pea* dan *Snow Pea*

Sampel	Berat wadah (g)	Berat Sampel (g)	Berat total (wadah+sampel) (g)	Berat setelah pemanasan (g)	Kadar Air (%)
<i>Snap Pea</i>	50,1937	5,332	55,5257	51,0716	83,75
				51,0688	
				51,0618	
				51,0604	
				51,0601	
<i>Snow Pea</i>	44,1085	5,085	49,1935	51,0605	85,07
				44,9229	
				44,8817	
				44,8795	
				44,8677	
	44,8674				
	44,8673				



Lampiran 1

Perhitungan Kurva Kalibrasi

Dari kurva kalibrasi didapatkan persamaan :

$$y = a + bx$$

r = koefisien korelasi

a dan b dihitung dengan rumus :

$$a = \frac{n \times \sum x_i \cdot y_i - (\sum x_i) \cdot (\sum y_i)}{n \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{(\sum x_i^2) (\sum y_i) - (\sum x_i) (\sum x_i \cdot y_i)}{n \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

Koefisien korelasi (r) dihitung dengan rumus :

$$r = \frac{n \times \sum x_i \cdot y_i - ((\sum x_i) \cdot (\sum y_i))}{\sqrt{\{(n \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2) \times (n \times \sum y^2 - (\sum y)^2)\}}}$$

Lampiran 2

Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Rumus :

a. Batas Deteksi (LOD) = $\frac{3 (S_{y/x})}{b}$

b. Batas Kuantitasi (LOQ) = $\frac{10 (S_{y/x})}{b}$

$$S_{y/x} = \left[\frac{\sum (y-y')^2}{n-2} \right]^{1/2}$$

Keterangan :

b = Arah garis linear dari kurva kalibrasi ; $y = a+bx$

$S_{y/x}$ = Simpangan baku residual

y = Luas puncak terukur

y' = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Lampiran 3

Perhitungan Simpangan Baku dan Koefisien Variasi

Perhitungan uji keterulangan dilakukan dengan mencari simpangan baku atau standar deviasi (SD) dan koefisien variasi.

Simpangan baku atau standar deviasi :

$$SD = \left[\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1} \right]^{1/2}$$

Koefisien variasi (RSD atau KV (%)) :

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

Keterangan :

x = Berat (ng)

\bar{x} = Berat rata-rata (ng)

n = Jumlah data

Lampiran 4

Perhitungan Uji Perolehan Kembali

Uji Perolehan Kembali (UPK) dihitung dengan rumus :

$$UPK = \frac{X'}{X} \times 100\%$$

Keterangan :

- X = Berat (ng) standar absolut yang ditotolkan ke lempeng KLT/KT
- X' = Berat (ng) sampel berdasarkan hasil perhitungan menggunakan persamaan kurva kalibrasi

Lampiran 5

Perhitungan Kadar

Kadar dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ kadar} = \frac{y - 1392,99}{38,8} = x$$

$$\frac{\frac{x}{5 \mu\text{L}} \times \text{faktor pengenceran} \times \text{jumlah volume awal (mL)}}{\text{Jumlah penimbangan}} \times 100\%$$

Persen kadar yang diperoleh kemudian dikalikan dengan faktor koreksi yang diperoleh dari uji perolehan kembali. Dalam hal ini 95,42%

Keterangan :

Kurva kalibrasi, $y = 1392,99 + 38,8x$

y = luas puncak yang diperoleh dari percobaan

x = kadar yang didapat setelah penotolan

$5 \mu\text{L}$ = jumlah penotolan

contoh perhitungan, $y = 5115,0$; penimbangan = 20,498 g

$$\frac{5115,0 - 1392,99}{38,8} = 95,93 \longrightarrow \frac{95,93}{5 \mu\text{L}} = 19,19 \text{ ppm}$$

$$19,19 \times \frac{100}{25} = 76,7425 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} = 7674,2474 \mu\text{g}$$

$$\longrightarrow \frac{7,67425 \text{ mg}}{20,42} \times 100 = 37,58 \text{ mg/100 g}$$

$$37,58 \times \frac{100}{95,42} = 39,39 \text{ mg/100 g}$$

Lampiran 6

Perhitungan Kadar Air

1. Cawan kosong dikeringkan dalam oven selama 15 menit pada suhu 100-105°C, didinginkan dalam desikator dan ditimbang berat cawan kosong (X)
2. Timbang 5,0 gram sampel ke dalam cawan kosong tadi (Y)
3. Panaskan cawan yang berisi sampel tadi selama 4-6 jam pada suhu 100-105°C
4. Cawan didinginkan dalam desikator kemudian ditimbang Cawan dipanaskan kembali dalam oven selama 30 menit, didinginkan dalam oven kemudian ditimbang. Pekerjaan ini dilakukan berulang kembali sampai berat konstan (Z).

Kadar air dihitung dengan rumus $\frac{X + Y - Z}{Y} \times 100\%$

Lampiran 7

Sertifikat Analisa Asam Askorbat

FROM : PT ENSEVAL PUTRA MEGA TRADING FAX NO. : 46822459

DEC. 06 2000 12:16PM P1

Takeda

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

HEAD OFFICE

1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-Ku

OSAKA, JAPAN

Article

Ascorbic Acid USP/BP/EP/FCC "Fine Granular"

Lot No.

HRSP387

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Date

JUNE 22, 2000

Test Items	Specifications	Results
Appearance	White to almost white crystals or crystalline powder	Pass
Odor	Odorless or almost odorless	Pass
Identification	Positive	Positive
Appearance of the solution	Within EP limit	Pass
Specific rotation	Between +20.5° and +21.5°	Pass (+21.0)
Copper	Not more than 5 ppm	Pass
Iron	Not more than 2 ppm	Pass
Heavy metals	Not more than 10 ppm	Pass
Arsenic	Not more than 3 ppm	Pass
Lead	Not more than 5 ppm	Pass
Oxalic acid	Within EP limit	Pass
Residue on ignition (Sulphated ash)	Not more than 0.1%	Pass (0.0 %)
Content	Not less than 99.0% and not more than 100.5%	Pass (100.0 %)
Particle size data	-	-
Thru U.S.No. 20	100%	Pass (100 %)
Thru U.S.No. 30	Not less than 95%	Pass (100 %)
On U.S.No. 100	Not less than 90%	Pass (94 %)
Organic volatile impurities	Meets USP requirements	Pass (by process validation)

Manufacturing date

JUNE 22, 2000

We hereby certify that the above-mentioned Ascorbic Acid USP/BP/EP/FCC "Fine Granular"

(Lot No. HRSP387) was analyzed and approved by our Quality Control Department.

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

H. Nako

CHIEF SCIENTIST HIROSHI NAKO

Lampiran 8

Sertifikat Analisa 2,4-Dinitrofenilhidrazin



Certificate of Analysis

<http://certificates.merck.de>

Date of print: 26.11.2009

1.03081.0000 2,4-Dinitrophenylhydrazine (stabilized with water) GR
for analysis Reag. Ph Eur

Spec. Values

Purity (HPLC)	≥ 99,0%
Identity (IR-spectrum)	passes test
Appearance	Orange-red to red, fine, crystalline to slightly cohesive powder.
Melting point	
capillary method, temperatur meassment in the heating block	197 - 200 °C
DSC (differential scanning calorimetry)	200 - 203 °C
Fe (Iron)	≤ 0.003 %
Chloro-2,4-dinitrobenzene (HPLC)	≤ 0.1 %
1,3-dinitrobenzene (HPLC)	≤ 0.05 %
Loss on drying (< 1 hPa)	≥ 25 %
Sulfated ash	≤ 0.1 %

All data refer to the dried substance (without appearance and loss on drying).

Dr. Ulrich Reichert

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

Lampiran 9a

Product Data Sheet ekstrak kacang polong Actiwhite®

LABORATOIRES SÉROBIOLOGIQUES
Division de Cognis France

Product Data Sheet

ACTIWHITE® LS 9808 provisional

General characterisation
Chemical description
Active ingredient containing Sucrose Dilaurate and Pisum Sativum extract.

Labeling information
INCI name(s)
Water (and) Glycerin (and) Sucrose Dilaurate (and) Polysorbate 20 (and) Pisum Sativum (Pea) Extract (US)
Aqua (and) Glycerin (and) Sucrose Dilaurate (and) Polysorbate 20 (and) Pisum Sativum Extract (EU)

Registrations

Ingredient	CASR-No.	EINECS/ELINCS-No.
Water	7732-18-5	231-791-2
Glycerin	56-81-5	200-289-5
Sucrose Dilaurate	25915-57-5	247-345-5
Polysorbate 20	9005-64-5	/
Pisum Sativum (Pea) Extract	90082-41-0	290-130-6

Officially listed in / Quality conforms to
/

Product properties
Appearance
Beige opalescent fluid gel with a weak odor.

Example of use
Usual dose of use : 2 - 3 %.

Mode of incorporation into a cosmetic product :
ACTIWHITE LS 9808 is incorporated into the finishing process below 60°C, or at room temperature for cold processing.
ACTIWHITE LS 9808 can also be introduced into the water phase of emulsions at 80°C.

Suitable between pH 4 and pH 8.

Lampiran 9b

Product Data Sheet ekstrak kacang polong Actiwhite®

ACTIWHITE LS 9808 is recommended for the use in skin lightening and anti-age spots preparations.

Characteristic values

The specifications stated in the paragraphs 'Quality control data' and 'Additional product descriptive data' finally and conclusively describe the properties of the Product.

Provisional quality control data

(Data which is used for quality release and is certified for each batch.)

Aspect : opalescent fluid gel

Color : beige

Odor : weak

pH : 4.0 - 6.0 [pure product] (according to PA. 14)

Water content [Karl & Fischer] 37.0 - 43.0 % (according to PA. 58)
(SW:0.150g)

Total nitrogen (SW:1.5g) 0.08 - 0.15 % (according to PA. 19)

Characterization of proteins POSITIVE (according to PA. 181)

[aqueous solution at 10 %]

Glycerol [aqueous solution at 1 %] 26.0 - 30.0 % (according to PA. 111)

Phenoxyethanol 1.80 - 2.20 % (according to PA. 79)

[aqueous solution at 0.4 % in methanol]

Sorbic acid 0.180 - 0.220 % (according to PA. 92)

[aqueous solution at 0.2 % in methanol]

Sucrose dilaurate 16.0 - 24.0 % (according to PA. 253)

[aqueous solution at 1 % in ethanol]

Additional product descriptive data

(Data which is proven statistically but not determined regularly.)

Methods of analysis

Microbiological information

- PROVISIONAL -

Total germs : < 100 CFU/g (according to Pba.1)

Pathogens : absent (according to Pba.2)

Gram negative bacteria : absent (according to Pba.5)

Storage and transportation

When stored properly at room temperature (15-25°C) in unopened original container, ACTIWHITE LS 9808 remains stable for at least 24 months.

All products in the text marked with an ® are trademarks of the Cognis group.

The information on product specifications provided herein is only binding to the extent confirmed by Cognis in a written Sales Agreement. COGNIS EXPRESSLY DISCLAIMS ANY RESPONSIBILITY FOR THE SUITABILITY OF THE PRODUCTS FOR ANY SPECIFIC OR PARTICULAR PURPOSES INTENDED BY THE USER. Suggestions for the use and application of the products and guide formulations are given for information purposes only and without commitment. Such suggestions do not release Cognis' customers from testing the products as to their suitability for the customer's intended processes and purposes. Cognis does not assume any liability or risk involved in the use of its products as the conditions of use are beyond its control. The user of the products is solely responsible for compliance with all laws and regulations applying to the use of the products, including intellectual property rights of third parties.

Lampiran 10

Determinasi Kacang Polong (*Pisum sativum* L.)

LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 29 Desember 2009

Nomor : 336/IPH.1.02/If.8/XII/2009
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). Koba Paul
DEPOK

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Kacang Polong	<i>Pisum sativum</i> L.	Leguminosae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,


Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
NIP. 195111041975011001