

**ANALISIS LUTEIN DALAM SUPLEMEN MAKANAN UNTUK
KESEHATAN MATA SECARA KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI**

**NURROTUL FAJRIYAH
0606040942**



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

**ANALISIS LUTEIN DALAM SUPLEMEN MAKANAN UNTUK
KESEHATAN MATA SECARA KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI**

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

Oleh:

Nurrotul Fajriyah

0606040942



DEPOK

2009

**SKRIPSI : ANALISIS LUTEIN DALAM SUPLEMEN MAKANAN
UNTUK KESEHATAN MATA SECARA
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

NAMA : NURROTUL FAJRIYAH

NPM : 0606040942

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2009

**Drs. HAYUN, M.Si
PEMBIMBING I**

**Dr. HERMAN SURYADI, MS
PEMBIMBING II**

SKRIPSI : ANALISIS LUTEIN DALAM SUPLEMEN MAKANAN
UNTUK KESEHATAN MATA SECARA
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

NAMA : NURROTUL FAJRIYAH

NPM : 0606040942

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2009


Drs. HAYUN, M.Si
PEMBIMBING I

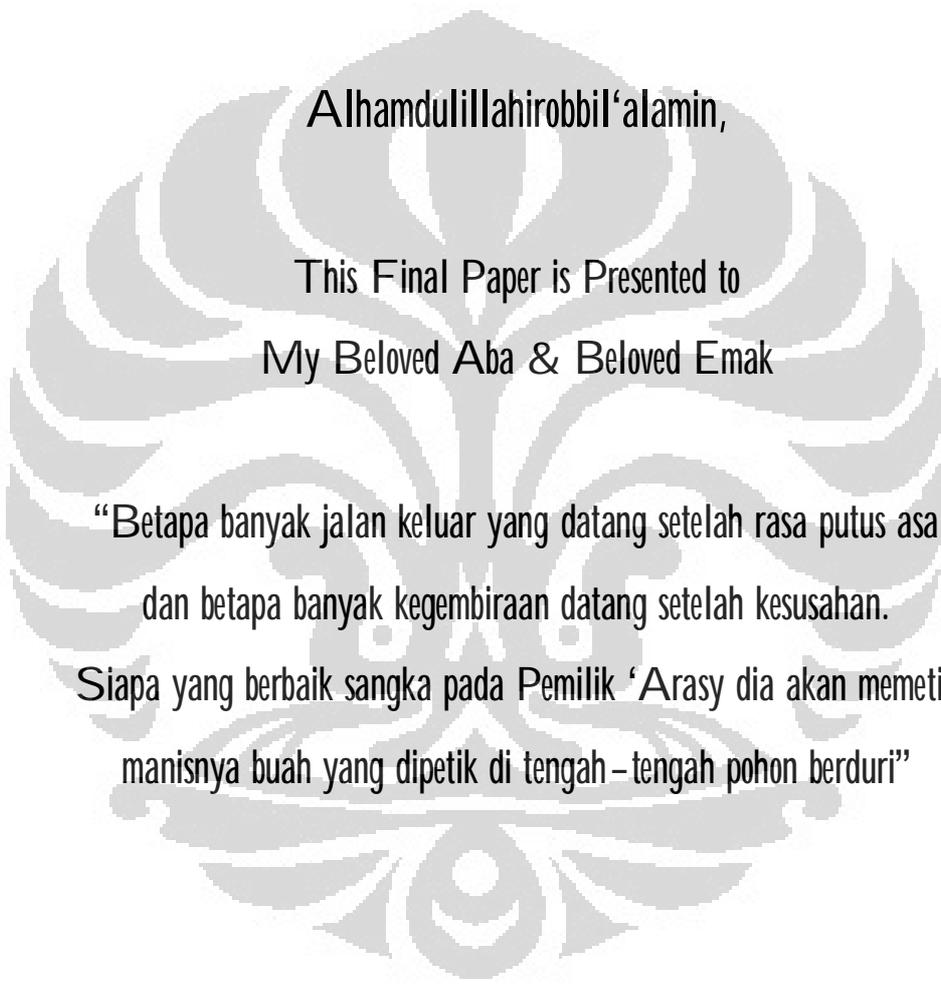

Dr. HERMAN SURYADI, MS
PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana:.....

Penguji I : Dra. Rosmaladewi Aziz.....

Penguji II : Dra. Sabarijah WittoEng, SKM.....

Penguji III : Dra. Retnosari Andrajati, MS, Ph.D., Apt.....



Alhamdulillahirobbil'alamin,

This Final Paper is Presented to
My Beloved Aba & Beloved Emak

“Betapa banyak jalan keluar yang datang setelah rasa putus asa
dan betapa banyak kegembiraan datang setelah kesusahan.
Siapa yang berbaik sangka pada Pemilik ‘Arasy dia akan memetik
manisnya buah yang dipetik di tengah-tengah pohon berduri”

KATA PENGANTAR

Syukur *Alhamdulillah*, penulis panjatkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala*, atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat dan salam tak lupa tercurah kepada nabi Muhammad *shallallaahu 'alaihi wa sallam*.

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

1. Bapak Drs. Hayun, M.Si dan Bapak Dr. Herman Suryadi, MS. sebagai pembimbing skripsi yang telah membimbing dan mengarahkan penulis selama penelitian sampai penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Drs. Umar Mansur, M.Sc. selaku pembimbing akademis yang telah memberikan bimbingan selama masa pendidikan di Departemen Farmasi.
3. Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.Si, selaku Ketua Pogram Sarjana Ekstensi yang telah memberikan bantuan untuk kelancaran skripsi ini.
4. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku ketua Departemen Farmasi UI.
5. Aba, Emak, adik dan nenek tersayang serta semua keluarga besar yang ada di Palembang yang selalu senantiasa memberikan doa dan dukungannya
6. Seluruh staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan ilmunya kepada penulis.

7. PT. Lapi Laboratories, PT. Kalbe Farma, PT. Nufarindo, PT. Pyridam Farma Tbk., PT. Soho, yang telah memberikan bantuan bahan baku.
8. Bapak H. Rustam Paun dan para karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI terutama Ibu Larmi, Mbak Tini, Bapak Ma'ruf dan Bapak Suroto yang telah memberikan bantuan sampai skripsi ini selesai.
9. Sahabatku Meila yang selalu menemani dan selalu bersama baik suka maupun duka serta Desy, Kiki, Muchan yang selalu mendoakan dan mendukungku dari jauh.
10. Rekan-rekan sejawat farmasi terutama untuk keluarga besar karotenoid (Esty, mbak Puji, Ari phe), Khairuddin, Sri Nurasih, Lily, Iin, Nanda, Shelly, Irma, Nur, Isabel, Galih, Tyas, dan mahasiswa-mahasiswa KBI Kimia Farmasi atas persahabatan, kebersamaan, semangat, bantuan, dan dukungan selama ini.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya yang juga banyak memberikan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis

2009

ABSTRAK

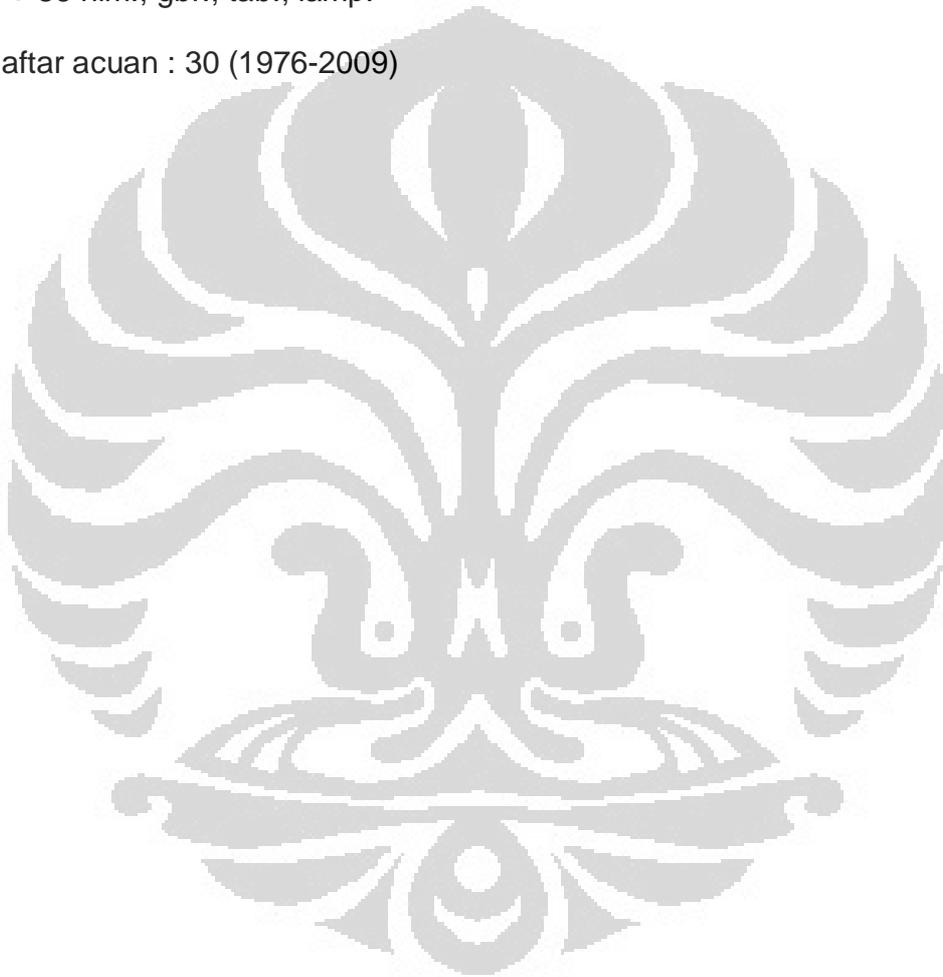
Perkembangan makanan kesehatan atau suplemen makanan didorong oleh kebutuhan masyarakat yang cenderung mengonsumsi zat gizi tidak seimbang sehingga berisiko terkena penyakit degeneratif. Lutein berguna untuk mencegah penyakit AMD (*Aged-related Macular Degeneration*) dan banyak dijual dalam bentuk suplemen makanan. Suplemen makanan yang diedarkan harus memenuhi persyaratan keamanan, mutu dan khasiat untuk melindungi masyarakat dalam mengonsumsi suplemen makanan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode analisis lutein dengan kondisi yang optimal dan tervalidasi serta menetapkan kadar lutein dalam satu sampel suplemen makanan untuk kesehatan mata dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Analisis dilakukan secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan menggunakan kolom fase terbalik (C18) Kromasil™ (25 cm x 4,6 mm), fase gerak metanol-diklormetan (60:40) dengan kecepatan alir 2,1 ml/menit. Lutein dalam standar dan sampel diekstraksi terlebih dahulu dengan pelarut campuran metanol-petroleum eter-etil asetat (1:1:1) sebelum disuntikkan ke KCKT. Hasil uji validasi menunjukkan bahwa metode ini telah memenuhi syarat uji presisi (koefisien variasi < 2%), koefisien korelasi (r) sebesar 0,9992, dan akurasi (99,94 ± 0,00135)% serta dengan menunjukkan batas deteksi dan batas kuantitasi

berturut-turut sebesar 0,0094 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,0314 $\mu\text{g/ml}$. Hasil analisis terhadap satu sampel menunjukkan kadar rata-rata lutein ($100,60 \pm 0,00026$)%.

Kata kunci : kromatografi cair kinerja tinggi; lutein; suplemen makanan.

xi + 86 hlm.; gbr.; tab.; lamp.

Daftar acuan : 30 (1976-2009)



ABSTRACT

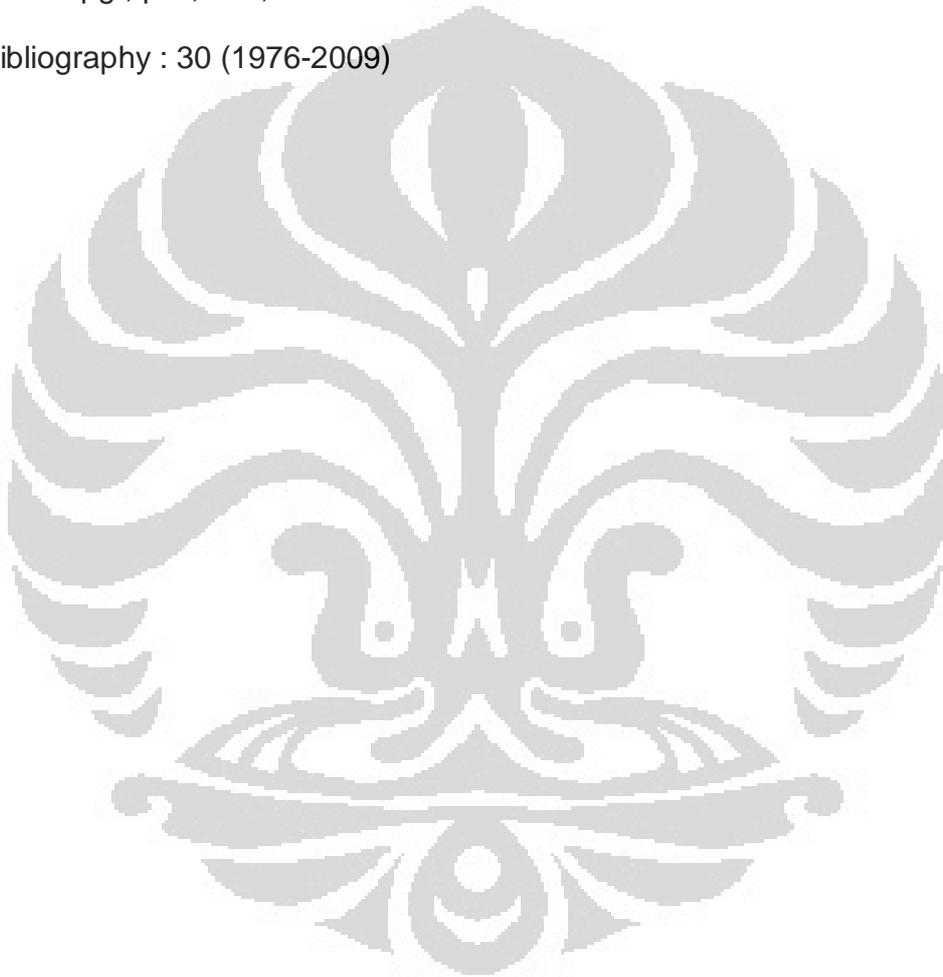
Healthy food or dietary supplement blooming which is urging by people's need which tend to consume unbalanced-nutrient food substances that could make degeneration diseases. The efficacy of lutein is preventing AMD (*Aged-related Macular Degeneration*) which is sold freely in form of dietary supplements. The dietary supplements must fill the requirement of safety, quality, and efficacy to protect people in consuming dietary supplement. The purposes of this research were to get the optimum analysis method of lutein and its validation and lutein concentration determination in one sample of dietary supplements for eye health by high performance liquid chromatography. The systems of high performance liquid chromatography consisted of a (C18) reversed-phase column Kromasil™ (25 cm x 4,6 mm), with methanol-dichlorometan (60:40) as mobile phase and flow rate 2,1 ml/minute. Standard and sample of lutein were extracted with solvents of metanol-petroleum eter-etil asetat (1:1:1) before injected to HPLC. This method has passed the requirement of precision (coefficient variation < 2%), coefficient corelation (r) 0,9992, and accuration (99,94 ± 0,00135)% that showed limit of detection and quantitation 0,0094 µg/ml and 0,0314 µg/ml

respectively. The result of analysis showed the average concentration of lutein in one sample of dietary supplement was $(100,60 \pm 0,00026)\%$

Key word : dietary supplement; high performance liquid chromatography; lutein.

xi + 86 pg.; pic.; tab.; enc.

Bibliography : 30 (1976-2009)



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar belakang.....	1
B. Tujuan penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Lutein.....	4
1. Sumber.....	4
2. Karakteristik kimia	5
3. Kegunaan lutein.....	7
B. Suplemen makanan.....	8
C. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	10
1. Teori	11
2. Komponen-komponen KCKT.....	12
3. Analisis KCKT.....	19

D. Validasi metode analisis.....	20
1. Selektivitas (spesifisitas).....	21
2. Keseksamaan (<i>precision</i>).....	21
3. Linieritas dan rentang.....	21
4. Batas deteksi dan batas kuantitasi.....	22
5. Kecermatan (akurasi).....	22
E. Metode analisis lutein.....	24
BAB III. ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA.....	30
A. Alat.....	31
B. Bahan.....	31
C. Cara kerja	31
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	38
A. Hasil percobaan	38
B. Pembahasan.....	40
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	47
A. Kesimpulan	47
B. Saran	48
DAFTAR ACUAN.....	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia lutein	5
2. Sistem isokratik pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	13
3. Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	53
4. Spektrum serapan larutan standar lutein 1,14 µg/ml dalam fase gerak metanol-diklormetan (60:40, v/v).....	54
5. Kromatogram larutan standar lutein 2,28 µg/ml dalam fase gerak metanol-diklormetan (70:30, v/v).....	55
6. Kromatogram larutan standar lutein 2,28 µg/ml dalam fase gerak metanol-diklormetan (60:40, v/v).....	56
7. Kromatogram larutan standar lutein 2,28 µg/ml dalam fase gerak asetonitril-metanol-diklormetan (75:20:5, v/v/v)	57
8. Kromatogram larutan standar lutein 0,0570 µg/ml dalam fase gerak metanol-diklormetan (60:40, v/v).....	58
9. Kurva kalibrasi lutein	59
10. Kromatogram uji perolehan kembali secara simulasi dengan konsentrasi larutan lutein 0,0912 µg/ml dalam fase gerak metanol-diklormetan (60:40, v/v).....	60
11. Kromatogram sampel suplemen makanan untuk kesehatan mata dengan merk X dengan konsentrasi pengukuran 0,0517 µg/ml	61

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kelarutan lutein dalam berbagai macam pelarut	62
2. Panjang gelombang dan serapan lutein	63
3. Pemilihan kondisi analisis optimum untuk analisis lutein dalam suplemen makanan.....	64
4. Hasil pengukuran larutan standar lutein untuk pembuatan kurva kalibrasi	65
5. Perhitungan secara statistik untuk menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi lutein.....	66
6. Hasil pengukuran standar lutein untuk data presisi.....	67
7. Hasil uji perolehan kembali lutein.....	68
8. Data kadar lutein dalam sampel.....	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara memperoleh persamaan garis linier.....	70
2. Cara perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi	71
3. Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi	72
4. Cara perhitungan uji perolehan kembali	73
5. Cara perhitungan kadar lutein dalam sampel	74
6. Bagan ekstraksi standar lutein.....	75
7. Bagan ekstraksi uji perolehan kembali 100%	76
8. Bagan ekstraksi sampel.....	77
9. Sertifikat analisis lutein (5%).....	78
10. Sertifikat analisis lutein (lanjutan)	79
11. Sertifikat analisis vitamin E asetat (50%).....	80
12. Sertifikat analisis betakaroten (20%)	81
13. Sertifikat analisis vitamin C.....	82

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Suplemen makanan merupakan produk yang dimaksudkan untuk melengkapi kebutuhan zat gizi makanan, mengandung satu atau lebih bahan berupa vitamin, mineral, asam amino atau bahan lain (berasal dari tumbuhan atau bukan tumbuhan) yang mempunyai nilai gizi atau efek fisiologis dalam jumlah terkonsentrasi (1).

Perkembangan makanan kesehatan atau suplemen makanan didorong oleh kebutuhan masyarakat yang cenderung mengonsumsi makanan dengan zat gizi tidak seimbang sehingga berisiko terkena penyakit degeneratif, seperti tekanan darah tinggi, gangguan jantung, stroke, dan kanker. Penyakit degeneratif juga meningkat dengan bertambahnya jumlah penduduk usia lanjut (2).

Menurut perkiraan Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), saat ini terdapat 180 juta penduduk dunia yang mengalami cacat penglihatan. Sebanyak 40-45 juta di antaranya tidak dapat melihat atau buta. Sembilan dari 10 penderita kebutaan tersebut berada di negara miskin dan berkembang, terutama negara-negara Afrika dan Asia Selatan atau Asia Tenggara. Khusus Indonesia, diperkirakan 3,1 juta jiwa (3).

Lutein merupakan sejenis karotenoid yang terdapat pada lensa mata dan wilayah makular retina. Lutein berguna untuk mencegah penyakit AMD

(*Aged-related Macular Degeneration*) dan banyak dijual dalam bentuk suplemen makanan.

Banyak orang sekarang ini menggunakan suplemen makanan dengan tujuan untuk menyeimbangkan kebutuhan gizi. Produk suplemen makanan mulai masuk Indonesia awal tahun 1990-an. Saat itu Pemerintah Indonesia belum siap menghadapi sehingga timbul masalah, antara lain produk sering diklaim sebagai obat, penjual lebih banyak menjelaskan keunggulan daripada efek samping bila dikonsumsi dalam jumlah berlebihan. Suplemen makanan yang diedarkan harus memenuhi persyaratan keamanan, mutu dan khasiat/manfaat untuk melindungi masyarakat dalam mengonsumsi suplemen makanan (1).

Pada tahun 1996 terbit Surat Keputusan Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan tentang Suplemen Makanan Nomor HK.00.063.02360. Di dalamnya diatur batasan suplemen makanan, batasan kadar vitamin, mineral dan asam amino, bahan tambahan makanan yang diperbolehkan untuk digunakan dalam suplemen makanan, persyaratan higiene dan keamanan, persyaratan kemasan, pelabelan serta periklanan dan promosi.

Banyak penelitian telah dilakukan untuk mengetahui hubungan lutein pada suplemen makanan dalam meningkatkan konsentrasi serum pigmen makula manusia salah satunya pada penelitian lutein, zeaxanthin, pigment makula, dan fungsi penglihatan pada pasien fibrosis sistik dewasa (Christine Schupp, dkk, 2004) dengan kesimpulan bahwa lutein dapat meningkatkan status okula dan fungsi penglihatan. Untuk menghasilkan manfaat sesuai

yang diharapkan maka sediaan suplemen harus dijamin mutunya, antara lain kebenaran kadar yang ditulis pada labelnya.

Pada penelitian ini telah dilakukan pengembangan dari beberapa penelitian analisis lutein yang telah dilakukan sebelumnya dengan diharapkan akan diperoleh metode yang lebih sederhana tetapi tetap selektif dan sensitif.

Metode analisis yang diperoleh divalidasi dengan parameter selektivitas, keseksamaan, linearitas, batas deteksi dan batas batas kuantitasi, dan kecermatan (akurasi).

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Memperoleh metode analisis dengan kondisi yang optimal dan tervalidasi untuk analisis lutein dalam suplemen makanan untuk kesehatan mata dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).
2. Menetapkan kadar lutein dalam satu sampel suplemen makanan untuk kesehatan mata dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. LUTEIN

Lutein merupakan salah satu jenis karotenoid, berwarna kuning yang banyak terdapat pada sayuran berwarna hijau dan juga terdapat pada lensa mata dan konsentrasi terbanyak terdapat pada bagian makula retina mata (8).

1. Sumber

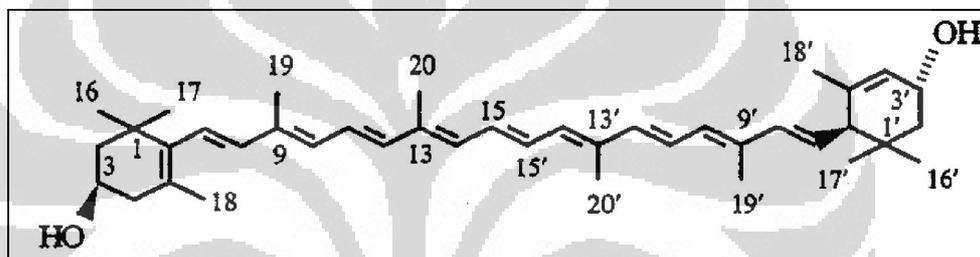
Lutein dapat diisolasi dari kuning telur, alga, dan daun bunga dari berbagai bunga berwarna kuning dan diekstraksi dari daun bunga *Tagetes patula* L (5). Lutein juga terdapat pada sayuran dan buah seperti jagung, bayam, kiwi, labu, jeruk, tomat, timun, kacang polong, buncis, melon, brokoli, anggur (18).

Daun kentang manis merupakan sumber lain lutein. Pada makanan, lutein dapat ditemukan baik dalam bentuk bebas, terikat pada protein, atau teresterifikasi sebagai mono- atau di-ester. Kebanyakan lutein ditemukan pada daun tumbuhan yang terikat dengan protein. Lutein dan *xanthophyl* lain bisa diekstrak dari jagung menggunakan alkohol, sebagai contoh: etanol dan isopropanol.

Walaupun bunga marigold (*Tagetes erecta*) merupakan sumber lutein yang paling besar, jagung (*Zea mays*) telah diidentifikasi sebagai sumber

lutein yang ekonomis karena jagung menghasilkan banyak produk seperti lutein, minyak jagung, zein (dikenal mempunyai aktivitas anti-mikroba dan anti-hipertensi) dimana produk-produk tersebut dapat diisolasi dari jagung bukan dari bunga marigold sehingga mempunyai manfaat yang lebih banyak (27)

2. Karakteristik Kimia (5, 6, 24)



Gambar 1. Struktur kimia lutein

Sinonim : β, ϵ -caroten-3,3'-diol, *xanthophyl*

Rumus Molekul : $C_{40}H_{56}O_2$

Bobot Molekul : 568,85 g/mol

Titik leleh : 183-190°C

λ max :

kloroform : 435nm 458 nm 485 nm

etanol : 422 nm 445 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 2250$) 474 nm

petroleum eter : 421 nm 445 nm 474 nm

Pemerian : prisma kuning dengan kilau metalik

Kelarutan :tidak larut dalam air, larut dalam lemak dan pelarut lemak, mudah larut dalam metanol mendidih (1:700) dibandingkan zeaxanthin. Mudah larut dalam THF (6). Kelarutan lutein dalam berbagai pelarut bisa dilihat pada Tabel 1.

Karakteristik penting dari lutein adalah adanya sembilan atau lebih ikatan rangkap terkonjugasi, dimana menyebabkan rentan terhadap cahaya, oksigen, panas, degradasi asam tetapi stabil jika disimpan pada suhu -20°C atau dibawah atmosfer nitrogen (27).

Struktur dasar lutein yaitu dari struktur karoten dimana rangka tetraterpen simetris yang terbentuk oleh sambungan ekor ke ekor dari dua unit C₂₀ yang tergabung dalam suatu susunan yang mana unitnya ini akan membalik di tengah molekul (28).

Absorpsi cahaya mengacu kepada seluruh struktur pada molekul yang disebut kromofor yang terdiri dari sebagian atau keseluruhan dari sistem konjugasi ikatan rangkap C=C, rantai polien. Pada sistem fotosintetis, rantai polien ini yang berjumlah 9-13 ikatan rangkap konjugasi, akan menyampaikan kemampuan untuk menyerap cahaya pada daerah tampak. Penggunaan spektrum cahaya tampak (*visible*) digunakan sebagai identifikasi dan analisis kuantitatif karotenoid (28).

Ikatan rangkap terkonjugasi ini memiliki kemampuan untuk menghentikan oksigen singlet dengan meningkatnya aktifitas tergantung dari

jumlah ikatan rangkap terkonjugasi. Struktur unik ini memberikan suatu fungsi sebagai antioksidan primer pada sistem biologi dengan mencegah radikal peroksida. Umumnya, karotenoid membentuk stabilitas resonansi kation radikal atau produk tambahan radikal, dimana tidak mampu untuk mengantisipasi dalam reaksi auto-oksidasi (28).

Adanya gugus hidroksil membuat lutein kelihatan jelas lebih polar dibandingkan analog mereka yaitu alfa- dan beta- karoten. Lutein larut dalam baik pelarut polar maupun non-polar (27). Seperti kebanyakan karotenoid lainnya, lutein tidak bisa dikonversikan ke bentuk vitamin A (25).

3. Kegunaan Lutein

Lutein dapat digunakan sebagai pewarna alami makanan, minuman, untuk konfeksi, kosmetik, dan makanan hewan. Mekanisme aksi lutein adalah sebagai antioksidan dan menyaring kerusakan oleh sinar biru pada pigmen makula mata (7). Lutein memberikan warna kuning-*orange* pada makula karena absorpsinya pada cahaya panjang gelombang pendek, dipercaya memainkan peranan penting pada perlindungan unsur-unsur retina dari radikal bebas, baik absorpsi efek fototoksik tinggi cahaya panjang gelombang pendek dan sebagai antioksidan dalam perlindungan terhadap radikal bebas. Penurunan konsentrasi plasma pigmen ini berhubungan dengan peningkatan kejadian degenerasi makula (9).

Perhatian akhir-akhir ini terhadap pigmen makula manusia (*human macular pigment*) yang mengandung lutein yang berhubungan dengan

penurunan resiko degenerasi makula terkait umur (*age-related macular degeneration, AMD*) (10).

Percobaan suplemen lutein pada manusia mengindikasikan bahwa karotenoid ini, dalam tambahan buah dan sayuran, dapat digunakan untuk meningkatkan konsentrasi pigmen makula. Kuning telur ayam, suatu matrik yang tersusun dari lipid yang dapat dicerna, seperti kolesterol, trigliserida, dan fosfolipid, juga mengandung lutein yang terdispersi dalam matrik dengan mikronutrien larut lemak seperti vitamin A, vitamin D, dan vitamin E (26).

B. SUPLEMEN MAKANAN (1)

Berdasarkan Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan No. 00.05.23.3644 Tahun 2004, suplemen makanan adalah produk yang dimaksudkan untuk melengkapi kebutuhan zat gizi makanan, mengandung satu atau lebih bahan berupa vitamin, mineral, asam amino atau bahan lain (berasal dari tumbuhan atau bukan tumbuhan) yang mempunyai nilai gizi atau efek fisiologis dalam jumlah terkonsentrasi.

Pada keputusan tersebut dalam pasal 4 menyatakan persyaratan bahwa suplemen makanan harus memiliki kriteria sebagai berikut:

- 1) Menggunakan bahan yang memenuhi standar mutu dan persyaratan kemasan serta standar dan persyaratan lain yang ditetapkan;

- 2) Kemanfaatan yang dinilai dari komposisi dan atau didukung oleh data pembuktian;
- 3) Diproduksi dengan menerapkan Cara Pembuatan yang Baik;
- 4) Penandaan yang harus mencantumkan informasi yang lengkap, obyektif, benar dan tidak menyesatkan.

Suplemen makanan dapat dikategorikan berdasarkan bahan yang terkandung didalamnya (29):

- 1) Vitamin dan mineral
 - a. Multivitamin dan mineral. Biasanya mengandung sekitar 100% vitamin yang termasuk dalam *Recommended Daily Allowance* (RDA) dengan jumlah mineral dan sedikit elemen.
 - b. Vitamin dan mineral tunggal dimana dalam jumlah sangat besar dan tingkatnya melebihi *Recommended Daily Allowance* (RDA), dan sering dikatakan sebagai “megadosis”.
 - c. Kombinasi vitamin dan mineral. Dijual untuk populasi spesifik, sebagai contoh untuk anak-anak, atlet, ibu hamil, pelangsing, remaja, vegetarian, dan sebagainya.
 - d. Kombinasi vitamin dan mineral dengan zat lainnya, seperti evening *primrose oil* dan ginseng.
- 2) Vitamin dan mineral yang “tidak resmi”, dimana untuk kebutuhan dan kekurangan yang tidak teratur pada manusia, seperti boron, kolin, inositol, silikon.

- 3) Minyak alami yang mengandung asam lemak dimana ada beberapa fakta efek manfaat, sebagai contoh: *evening primrose oil* dan ginseng.
- 4) Bahan alami yang mengandung bahan-bahan herbal dengan aksi farmakologi yang diakui tetapi komposisi dan efek belum ditetapkan seutuhnya, contohnya *echinacea*, *gingko biloba* dan ginseng.
- 5) Bahan alami yang mana komposisinya dan efek tidak ditetapkan dengan baik tetapi dijual untuk memberi peningkatan kesehatan, misalnya *chlorella*, *royal jelly*, dan *spirulina*.
- 6) Enzim yang diketahui efek psikologi, tetapi tidak ada keragu-raguan akan kemanjuran ketika di mulut, contohnya: *superoxide dismutase*.
- 7) Asam amino atau asam amino derivatif, contohnya: *N-acetyl cysteine*, *S-adenosyl methionine*.

C. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Analisis sediaan farmasi dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri, volumetri, kromatografi. Akan tetapi dalam perkembangannya metode yang sering digunakan adalah kromatografi. Teknik kromatografi telah berkembang dan telah digunakan untuk memisahkan dan mengkuantifikasi berbagai macam komponen yang kompleks, baik komponen organik maupun komponen anorganik (4). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan metode yang tidak

destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif.

1. Teori

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas) (11).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan teknik analisis yang paling cepat berkembang dalam analitik. Penggunaannya yang sangat banyak terdiri atas berbagai metode dalam kromatografi cair. Sejak pertengahan tahun 1980, KCKT merupakan metode bioanalisis obat yang paling banyak digunakan, alasan kecepatan serta efisiensi dominan dari KCKT menjadikannya sebagai pilihan utama dalam analisis. Selain itu, KCKT juga memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode lainnya. Kelebihan itu antara lain (4, 12, 13, 14)

a) Waktu analisis cepat

Biasanya waktu analisis kurang dari satu jam, banyak analisis yang dapat dilakukan dalam 15-30 menit, untuk analisis yang tidak rumit dapat dicapai waktu analisis yang kurang dari 5 menit.

b) Daya pisah (resolusi) baik

Kemampuan pelarut untuk berinteraksi secara selektif dengan fase diam dan fase gerak memberikan parameter tambahan untuk mencapai parameter yang dikehendaki.

c) Kepekaan yang tinggi

Kepekaannya sangat tergantung pada jenis detektor dan eluen yang digunakan.

d) Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi

e) Kolom dapat digunakan kembali

f) Mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran

g) Mudah untuk memperoleh kembali analit

h) Dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis

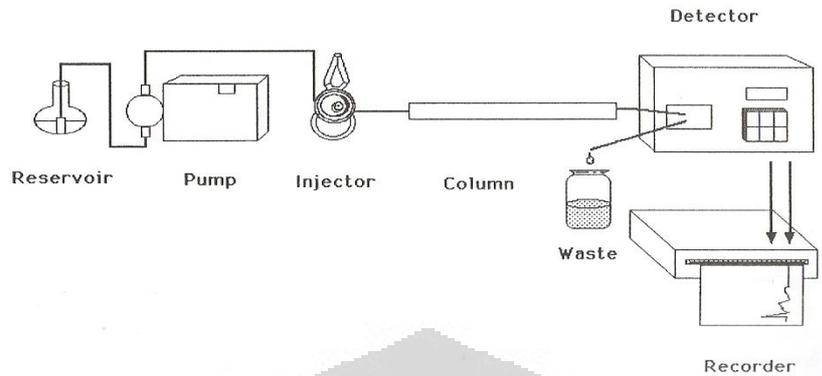
i) Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah

Hal ini sangat bergantung pada detektor yang digunakan. Namun detektor KCKT dapat mendeteksi zat sampai dengan kadar *ppt* (*part per trillion*).

j) Dapat digunakan bermacam-macam detektor.

2. Komponen-komponen KCKT

KCKT memiliki beberapa komponen yang berbeda. Komponen-komponen KCKT terdiri dari pompa, injektor, kolom, detektor, dan integrator (12).



Gambar 4. Sistem Isokratik pada kromatografi cair kinerja tinggi (30)

a. Pompa (*Pumps*)

Pada hampir semua sistem KCKT modern membutuhkan pompa untuk menghantarkan fase gerak melalui kolom pada kecepatan alir yang konstan. Pompa, segel-segel pompa dan semua penghubung dalam sistem kromatografi harus terbuat dari bahan yang secara kimiawi tahan terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam (4). Ada dua tipe pompa yang digunakan, yaitu kinerja konstan (*constant pressure*) dan pemindahan konstan (*constant displacement*). Pemindahan konstan dapat dibagi menjadi dua, yaitu pompa *reciprocating* dan pompa *syringe* (13).

b. Injektor (*Injector*)

Injektor berfungsi untuk memasukkan analit ke dalam kolom. Agar memperoleh kinerja kolom yang baik, hal yang paling dasar dalam memasukkan sampel ke dalam kolom adalah dengan cara yang tepat.

Idealnya, sampel harus dimasukkan dalam sejumlah kecil pelarut sehingga analit akan mengandung sedikit penyumbat sampai analit mencapai puncak kolom kromatografi (14).

Jenis-jenis injektor (13) :

- 1) Aliran henti (*stop-flow*) : Aliran dihentikan, penyuntikan dilakukan pada tekanan atmosfer, setelah sistem ditutup aliran dilanjutkan kembali.
- 2) Septum : Merupakan injektor langsung pada aliran, dapat digunakan pada kinerja sampai 60 – 70 atmosfer. Tetapi septum ini tidak tahan dengan semua pelarut kromatografi cair. Partikel kecil dari septum yang terkoyak (akibat jarum injektor) dapat menyebabkan penyumbatan.
- 3) Katup jalan kitar : Biasanya dipakai untuk menyuntikkan volume lebih besar dari 10 μ l dan dilakukan dengan cara otomatis (dengan menggunakan adaptor yang sesuai, volume yang lebih kecil dapat diinjeksikan secara manual).
- 4) Auto-injektor : Merupakan otomatisasi dari katup jalan kitar.

c. Kolom (*Column*)

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom merupakan bagian penting dalam KCKT karena ikut menentukan keberhasilan analisis. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok (13) :

- 1) Kolom analitik : Diameter dalam 2-6 mm. Panjang kolom tergantung pada jenis material pengisi kolom. Untuk kemasan *pellicular*, panjang yang digunakan adalah 50-100 cm. Untuk kemasan poros mikropartikel, 10-30 cm. Dewasa ini ada yang 5 cm.
- 2) Kolom preparatif : Umumnya memiliki diameter 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom 25-100 cm.

Kemampuan kolom untuk memisahkan senyawa yang dianalisis merupakan ukuran kinerja kolom. Dasar yang banyak digunakan untuk pengukuran kinerja kolom adalah resolusi (R) dan efisiensi kolom. Daya pisah ini sangat dipengaruhi oleh faktor kapasitas tiap komponen sampel (12,13).

d. Detektor (*Detector*)

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya. Detektor yang baik memiliki sensitifitas tinggi, gangguan (*noise*) yang rendah, memiliki *range* linier yang dinamis, dan memberi respon untuk semua tipe senyawa. Macam-macam detektor yang dapat digunakan antara lain (4, 12, 13) :

- 1) Detektor serapan optik

Detektor optik yang bekerja berdasarkan absorpsi ultraviolet-visibel mencakup lebih dari 70% sistem deteksi KCKT. Digunakan untuk mendeteksi komponen zat yang menyerap cahaya di daerah ultraviolet (190-400nm), cahaya tampak (400-700nm), dan infra red (2-25 μm).

Senyawa yang memiliki gugus kromofor berupa ikatan rangkap terkonjugasi ataupun suatu gugus fungsional menyebabkan terjadinya serapan di daerah UV dan tampak. Detektor UV merupakan detektor serapan optik yang paling banyak digunakan pada KCKT karena tidak merusak cuplikan, mudah dioperasikan, dan mudah dirawat.

2) Detektor indeks bias (RID)

Detektor ini akan merespon setiap perbedaan indeks bias antara analit (zat terlarut) dengan pelarutnya (fase geraknya).

3) Detektor fluoresensi

Fluoresensi merupakan fenomena luminisensi yang terjadi ketika suatu senyawa menyerap sinar UV atau visibel lalu mengemisikannya pada panjang gelombang yang lebih besar. Tidak semua senyawa obat mempunyai sifat fluoresen sehingga detektor fluoresensi ini sangat spesifik.

4) Detektor *photodiode-array* (PDA) (4)

Detektor PDA merupakan detektor UV-Vis dengan berbagai keistimewaan. Detektor ini mampu memberikan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses.

5) Detektor elektrokimia (ECD)

Banyak senyawa organik (termasuk obat) dapat dioksidasi atau direduksi secara elektrokimia pada elektroda yang cocok. Arus yang

dihasilkan pada proses ini dapat diperkuat hingga memberikan respon yang sesuai. Kepekaan detektor elektrokimia pada umumnya tinggi.

- 6) Detektor ionisasi nyala (FID)
- 7) Detektor *evaporation light scattering* (ELSD)
- 8) Detektor radioaktif.

e. Integrator, Komputer, atau Rekorder

Alat pengumpul data seperti komputer, integrator, atau rekorder dihubungkan dengan detektor. Alat ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu mem-plotkannya sebagai suatu kromatogram yang selanjutnya dapat dievaluasi oleh seorang analis (pengguna) (4).

Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak. Ada dua macam integrator yaitu (12) :

- 1) Integrator piringan yang bekerja secara mekanis
- 2) Integrator digital/elektronik, dapat memberikan ketelitian tinggi dan waktu integrasi yang singkat.

f. Fase gerak

Didalam kromatografi cair komposisi dari fase gerak adalah salah satu dari variabel yang mempengaruhi pemisahan. Variasi fase gerak pada KCKT sangat beragam dalam hal kepolaran dan selektivitasnya terhadap komponen dalam sampel. Senyawa yang akan dipisahkan harus larut dalam pelarut

yang digunakan. Pelarut ini tidak perlu tepat sama dengan fase gerak yang digunakan, akan tetapi pelarut tersebut harus dapat larut dalam fase gerak.

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri dari atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel (4).

Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan dapar dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk pemisahan dengan fase normal, fase gerak yang paling sering digunakan adalah campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan pelarut terklorisasi atau menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol (4). Secara umum fase gerak yang baik harus mempunyai sifat sebagai berikut (12, 13, 14) :

- 1) Murni, tidak terdapat kontaminan
- 2) Tidak bereaksi dengan kolom
- 3) Sesuai dengan detektor
- 4) Dapat melarutkan sampel
- 5) Selektif terhadap komponen
- 6) Memiliki viskositas rendah
- 7) Bila diperlukan, memudahkan "*sample recovery*"
- 8) Dapat memisahkan zat dengan baik
- 9) Diperdagangan dapat diperoleh dengan harga murah.

g. Fase Diam (4)

Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen. Oktadesil silika (ODS atau C_{18}) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi.

3. Analisis KCKT (4)

a. Analisa kualitatif

Analisis kualitatif dilakukan dengan memperhatikan waktu retensi. Komponen yang dipisahkan dapat diidentifikasi dari waktu retensinya yang dibandingkan dengan waktu retensi dari senyawa standar yang dipisahkan pada kondisi kromatografi yang sama.

b. Analisis kuantitatif

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya.

Beberapa metode analisis kuantitatif KCKT yang dapat digunakan yaitu :

1). Metode baku luar (*external standard method*)

Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kurva kalibrasi dibuat antara luas puncak terhadap konsentrasi. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi baku atau dengan perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan

baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan (13).

2). Metode baku dalam (*internal standard method*)

Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan baku pembanding. Kemudian larutan campuran komponen baku pembanding dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan dihitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Kurva kalibrasi dibuat antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen baku pembanding. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva baku pembanding. Keuntungan metode ini adalah kesalahan volume injeksi dieliminir, maka metode ini biasanya mempunyai presisi yang lebih baik daripada menggunakan baku luar. Kesulitan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat (13).

D. VALIDASI METODE ANALISIS (15)

Validasi metode 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 metode analisis, yaitu:

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

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 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*).

3. 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.

4. 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.

5. Kecermatan (akurasi)

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 hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematis didalam keseluruhan tahapan analisis.

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 (senyawa pembanding kimia CRM atau SRM) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) 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 kedalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Kriteria kecermatan sangat tergantung kepada konsentrasi analit dalam matriks sampel dan pada keseksamaan metode (RSD).

Kadar analit dalam metode penambahan baku dapat dihitung sebagai

berikut:

$$\frac{C}{C+S} = \frac{R1}{R2}$$

C = Kadar analit dalam sampel

S = Kadar analit yang ditambahkan pada sampel

R1 = Respon yang diberikan sampel

R2 = Respon yang diberikan campuran sampel dengan tambahan analit.

Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{C_f - C_a}{C^*b} \times 100\%$$

Cf = Konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

Ca = Konsentrasi sampel sebenarnya

C*a = Konsentrasi analit yang ditambahkan.

E. METODE ANALISIS LUTEIN

Beberapa metode analisis lutein yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti, yaitu:

1) Judul penelitian : *A Comparison of The Levels of Lutein and Zeaxanthin in Corn germ Oil, Corn Fiber Oil and Corn Kernel Oil* (16).

Kondisi : metode KCKT fase normal, dengan kolom Lichosorb 7 Diol, 3 x 100 mm (Varian Scientific, Lake City, CA, USA)

Fase gerak : fase gerak isokratik terdiri dari heksan-isopropanol-asam asetat: (96,9:3.0:0.1)

Laju alir : 0,5 ml/min

Detektor : analisa KCKT dihubungkan dengan Angilent Model 1100 dengan autosampler dan Angilent Model 1100 *diode array detector* untuk mengukur serapan visibel karotenoid.

Panjang gelombang : 450 nm

2) Judul penelitian : *Solubility, Uptake and Biocompatibility of Lutein and Zeaxanthin Delivered to Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells in Tween40 Micelles* (17)

Kondisi : KCKT-RP seri HP 1100 (Hewlet Packard, Waldbrom, Jerman) dengan kolom YMC C30-RP, 250 x 4,6 mm, 5 μ m, prekolom YMC C30-RP, 10 x 4 mm, 5 μ m (YMC europe, Scrcrmbeck, Jerman)

Fase gerak : terdiri dari eluen A (metanol) dan eluen B (TBME-metanol-air : 90:6:4)

Laju alir : 1 ml/menit

Detektor : diode array

Panjang gelombang : 450 nm

Volume injeksi : 40 μ l

3) Judul penelitian : *Fruits and Vegetables that are Sources for Lutein and Zeaxanthin: Macular Pigment in Human Eyes* (18).

Kondisi : metode KCKT fase terbalik 5 μ m kolom C18, 250 x 4,6 mm (VYDAC, 218TP54, Hesperia, CA, USA) dengan prekolom (40 x 4,6 mm)

Fase gerak : asetonitril-metanol (85:15), dengan 0,01% (w/v) amonium asetat

Laju alir : 1,2 ml/min
Detektor : diode array
Panjang gelombang : 450 nm
Standar : internal standar Apo-10'-carotenal-methyl oxime

4) Judul penelitian : *Lutein and Zeaxanthin Dietary Supplements Raise Macular Pigment Density and Serum Concentration of These Carotenoid in Humans* (10)

Kondisi : metode KCKT fase terbalik, dengan kolom 250 x 4,6 mm Ultracarb ODS 3- μ m (Phemomenex, Torrance, CA)

Fase gerak : fase gerak asetonitril-metanol (85:15) dengan tambahan 0,1% triethylamin

Laju alir : 1 ml/min

Panjang gelombang : 451 nm

Standar : internal standar monohexyl lutein ether

5) Judul penelitian : *Liquid Chromatographic Method for Determination of Lutein in Milk and Pediatric Formulas* (19)

Kondisi : metode KCKT fase terbalik YMC C30, 250 x 4,6 mm, 3 μ m

Fase gerak : metanol-diklormetan (70:30)

Laju alir : 0,5 ml/min

Detektor : photodiode array (370-600 nm)

Panjang gelombang : 450 nm

- 6) Judul penelitian : *Retinol, α -tocopherol, Lutein/Zeaxanthin, β -cryptoxanthin, Lycopene, α -caroten, Trans- β -carotene, and Four Retinyl Esters in Serum Determinated Simultaneously by Reversed-phase HPLC wih Multiwaveleght Detection (20)*

Kondisi : metode KCKT fase terbalik kolom C18,
Ultramex (150 x 4,6 mm)

Fase gerak : asetonitril-etanol (1:1), mengandung 0,1%
dietilamin/liter larutan

Laju alir : 0,9 ml/min

Detektor : UV model 490

Panjang gelombang : 450, 325, 300 nm

Standar : lutein dan zeaxanthin, β -cryptoxanthin, retinol,
 α -tocopherol, lycopene, α -carotene, β -
carotene, α -cryptoxanthin, 2', 3'-
anhydrolutein

- 7) Judul penelitian : *Lutein and β -carotene from Lutein-containing Yellow Carrot are Bioavaiable in Humans (7)*

Kondisi : KCKT *water resolve* kolom C18 (5 μ m. 3,9 x 300 mm: *waters*, Milford, MA) dilengkapi dengan *guard* kolom

Fase gerak : (gradien) asetonitril-air (95:5) dengan 10 mmol ammonium acetat/L dan 0,1% trietylamin sebagai pelarut A dan asetonitril-metanol-diklorektan (85:10:5) dengan 10 mmol amonium asetat/L dan 0,1 % trietylamin sebagai pelarut B

Laju alir : 2 ml/min

Standar : β -apo-8'-carotenyl dekanolat

8) Judul penelitian : *Lutein and Zeaxanthin in New Dietary Supplements-analysis and Quantification* (21)

Kondisi : KCKT HP1050 modular system 9hewlett-packard, Waldbrom, germany) dengan DAD analitik kolom YMC (YMC Europe, Schermbeck, germany dengan 5 μ -nm C30 fase terbalik 9250 x 4,6 mm) termasuk prekolom (10 x 4,0 mm) dan disimpan pada suhu 35°C

Fase gerak : fase gerak (elusi gradien) menggunakan metanol-TBME-air (81:15:4) untuk A dan 6:90:4 untuk B

Laju alir : 1,0 ml/min

Detektor : *mass-spectrometry* (MS)

Panjang gelombang: 450 nm (*band width* ±50nm)

9) Judul penelitian : *Lutein and Zeaxanthin Status and Risk of Age-Related Macular Degeneration* (22).

Kondisi : HPLC-model 1100, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, 10 mm, 5 µm *metal-free guard column*, dengan 100 x 4,6 mm, 5 µm *metal-free column* (model ODS2; Hewlett Packard)

Fase gerak : fase gerak asetonitril-metanol-diklorometan (75:20:5)

Detektor : Ultraviolet-visible

Panjang gelombang : 450 nm

BAB III

ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA

A. Alat

1. Alat kromatografi kinerja tinggi (Shimadzu, LC-10AD VP) yang dilengkapi dengan detektor Visible (SPD-6AV, Shimadzu), kolom Kromasil™ LC-18 dengan dimensi kolom 25 cm x 4,6 mm dan ukuran partikel 5µm, serta pemroses data Class LC-10 dan interface CBM 102 (Shimadzu),
2. Syringe berukuran 25,0 µL (Hamilton, Nevada)
3. Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu Jasco V-530), kuvet
4. Timbangan analitik
5. Penyaring fase gerak beserta pompa (Portable Diaphragm Aspirator BMX-1)
6. *Waterbath*
7. Ultrasonik (Elma S60H)
8. Vorteks
9. Sentrifugator (Kubota 5100)
10. Tabung sentrifugasi 15,0 ml
11. Penyaring sampel *millipore* Whatman 0,45 µm
12. Lemari es
13. Kertas saring Whatman
14. Balon karet, alumunium voil, vial coklat, dan alat-alat gelas

B. BAHAN

1. Baku standar Lutein 5,4% terenkapsulasi (PT. LAPI Laboratories)
2. Betakaroten 20% terenkapsulasi (PT. LAPI Laboratories)
3. Vitamin E asetat 50% (PT. LAPI Laboratories)
4. Vitamin C (PT. LAPI Laboratories)
5. Metanol Pro HPLC (Merck)
6. Diklormetan Pro HPLC (Merck)
7. Asetonitril Pro HPLC (Merck),
8. Aquabidestilata (Otsuka)
9. Petroleum eter pro analisis (Mallinckrodt)
10. Etil asetat pro analisis (Merck)
11. Amilum
12. Talk
13. Satu jenis sampel suplemen makanan untuk kesehatan mata merk X berupa kaplet

C. CARA KERJA

1. Pembuatan larutan induk standar lutein

Standar lutein yang didapatkan berupa serbuk yang ter-*coating* dan tidak murni oleh karena itu lutein harus dipisahkan dari lapisan *coating*-nya. Ditimbang secara seksama lebih kurang 100 mg standar lutein (5,4%), kemudian dimasukkan dalam labu ukur 5,0 ml, ditambahkan air, dikocok sampai homogen dan ditambahkan lagi air sampai batas,

kemudian panaskan di *waterbath* dengan suhu 50°C selama 1 menit, dan diultrasonik selama 2 menit. Larutan kemudian dituang ke dalam tabung sentrifugasi 15,0 ml yang dilapisi dengan aluminium foil sebelumnya. Labu ukur dibilas menggunakan pelarut campuran metanol-petroleum eter-etil asetat (1:1:1) sebanyak 5,0 ml, lalu cairan bilasan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, divorteks selama 3 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 2 menit. Larutan lapisan atas yang berwarna kuning diambil. Hal yang sama dilakukan sebanyak dua kali lagi sampai larutan lapisan bawah berwarna jernih dan dicampurkan dengan ekstrak yang diperoleh sebelumnya. Kumpulan larutan ekstrak dikeringkan di atas *waterbath* dengan suhu 45° C selama lebih kurang 5 menit, didapatkan ekstrak kering lutein. Kemudian dilarutkan dengan fase gerak metanol-diklorometan (60:40) dalam labu ukur 25,0 ml.

2. Pencarian kondisi analisis optimum untuk analisis lutein

a) Penetapan panjang gelombang analisis

Larutan induk standar lutein diencerkan dengan metanol-diklorometan (60:40) hingga diperoleh konsentrasi 1,1400 µg/ml. Kemudian dibuat spektrum serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm.

b) Pemilihan fase gerak dan kecepatan alir untuk analisis lutein

Dibuat larutan lutein dengan konsentrasi lebih kurang 2 µg/ml dengan cara mengencerkan dari larutan induk standar yang telah dibuat sebelumnya. Kemudian sebanyak 20 µL larutan diinjeksikan pada alat KCKT. Parameter yang diubah adalah komposisi fase gerak dan kecepatan alir. Fase gerak yang dicobakan untuk proses elusi dibuat dengan komposisi sebagai berikut:

- a. Metanol-diklormetan (70:30)
- b. Metanol-diklormetan (60:40)
- c. Asetonitril-metanol-diklormetan (75:20:5)

Elusi dengan komposisi fase gerak yang berbeda-beda ini dilakukan dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit dan dideteksi pada panjang gelombang *visible* maksimum yang diperoleh pada percobaan a. Masing-masing kondisi di atas dicatat waktu retensinya, dihitung faktor ikutan, dan jumlah lempeng teoritis. Kondisi terpilih adalah kondisi yang menunjukkan harga lempeng teoritis (N) yang besar, HETP kecil, faktor ikutan yang rendah.

3. Validasi metode analisis lutein

a) Uji presisi

Larutan standar lutein dibuat dengan tiga konsentrasi masing-masing 0,04; 0,13; 0,22 µg/ml. Sebanyak 20,0 µL masing-masing larutan

disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak enam kali untuk tiap konsentrasi.

b) Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linieritas larutan standar lutein

Dibuat variasi 6 larutan lutein dengan konsentrasi 0,04; 0,05; 0,06; 0,13; 0,15; 0,22 $\mu\text{g/ml}$ dari larutan induk. Sebanyak 20,0 μL masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dari data pengukuran kemudian dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan regresi linier. Regresi linier dihitung antara luas puncak terhadap konsentrasi lutein, sehingga diperoleh koefisien korelasi (r) yang menunjukkan linieritasnya.

c) Pengukuran batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) analisis lutein

Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung secara statistik melalui persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi. Rumus untuk perhitungannya adalah sebagai berikut:

d) Uji Perolehan Kembali (akurasi)

Uji perolehan kembali yang dilakukan menggunakan metode simulasi dimana dibuat tiga simulasi (80%, 100%, 120%). Konsentrasi simulasi

100% ditimbang masing-masing zat tambahan yaitu vitamin E asetat 13 mg, vitamin C 21 mg, amilum 67 mg, talk 5 mg. Bahan tambahan ini dihitung berdasarkan yang tertera pada kemasan sampel. Untuk betakaroten dipipet 1,0 ml dari larutan induknya (239,984 $\mu\text{g/ml}$), lalu langsung dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 ml. Kemudian tambahkan 1,0 ml larutan lutein yang dipipet dari larutan induk lutein (228,0096 $\mu\text{g/ml}$), ditambahkan air, dikocok sampai homogen dan ditambahkan lagi air sampai batas, lalu di ultrasonik selama 2 menit. Larutan kemudian dituang ke dalam tabung sentrifugasi 15,0 ml yang dilapisi dengan aluminium foil sebelumnya. Labu ukur dibilas menggunakan pelarut campuran metanol-petroleum eter-etil asetat (1:1:1) sebanyak 5,0 ml, lalu cairan bilasan dimasukkan dalam tabung sentrifugasi divorteks selama 3 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 2 menit. Larutan lapisan atas yang berwarna kuning diambil. Hal yang sama lagi sebanyak dua kali lagi, sampai larutan lapisan bawah berwarna jernih dan dicampurkan dengan ekstrak yang diperoleh sebelumnya. Kumpulan larutan ekstrak dikeringkan di atas *waterbath* dengan suhu 45°C selama lebih kurang 5 menit, didapatkan ekstrak kering lutein kemudian dilarutkan dengan fase gerak metanol-diklormetan (60:40) dalam labu ukur 10,0 ml. Dilakukan pengenceran sehingga akan didapatkan konsentrasi 0,1140 $\mu\text{g/ml}$. Larutan hasil pengenceran dimasukkan ke dalam botol vial coklat selanjutnya

disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, di ulang sebanyak tiga kali untuk tiap konsentrasi. Luas puncak lutein dicatat kemudian dihitung persentase uji perolehan kembali lutein. Lakukan hal yang sama untuk simulasi 80% dan 120%.

4. Analisis lutein dalam satu sampel

Timbang dua kaplet lalu catat bobot total keduanya, digerus homogen lalu timbang secara seksama lebih kurang 50,0 mg sampel kemudian dimasukkan dalam labu ukur 5,0 ml, ditambahkan air, dikocok sampai homogen dan ditambahkan lagi air sampai batas, kemudian dipanaskan di *waterbath* dengan suhu 50°C selama 1 menit dan di ultrasonik selama 2 menit. Larutan kemudian dituang ke dalam tabung sentrifugasi 15,0 ml yang dilapisi dengan alumunium foil sebelumnya. Labu ukur dibilas menggunakan pelarut campuran metanol-petroleum eter-etil asetat (1:1:1) sebanyak 5,0 ml, lalu cairan bilasan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, divorteks selama 3 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 2 menit. Larutan lapisan atas yang berwarna kuning diambil. Hal yang sama dilakukan lagi sebanyak dua lagi sampai larutan lapisan bawah berwarna jernih dan dicampurkan dengan ekstrak yang diperoleh sebelumnya. Kumpulan larutan ekstrak dikeringkan di atas *waterbath* 45°C selama lebih kurang 5 menit didapatkan ekstrak kering lutein. Kemudian dilarutkan dengan fase gerak metanol-diklormetan (60:40) dalam labu ukur 10,0 ml lalu dilakukan pengenceran.

Larutan hasil pengenceran dimasukkan ke dalam botol vial coklat selanjutnya disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, di ulang sebanyak tiga kali untuk tiap konsentrasi. Lakukan hal yang sama sebanyak dua kali lagi untuk penimbangan dua kali. Berdasarkan luas puncak, dihitung kadar sampel menggunakan persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PERCOBAAN

1. Pembuatan larutan induk standar lutein

Standar lutein yang telah ditimbang secara seksama 105,56 mg (5,4%) dan telah dilakukan proses ekstraksi terlebih dahulu diperoleh larutan induk standar lutein dengan konsentrasi 228,0096 µg/ml (perhitungan berdasarkan konsentrasi lutein pada sertifikat analisa yaitu 5,4%).

2. Pencarian kondisi analisis optimum untuk analisis lutein

a. Penetapan panjang gelombang analisis

Panjang gelombang maksimum lutein dalam fase gerak metanol-diklormetan (60:40) yang memberikan serapan dengan nilai maksimum yaitu 447 nm. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4 serta Tabel 2.

d. Pemilihan fase gerak dan kecepatan alir untuk analisis lutein

Hasil percobaan yang telah dilakukan diperoleh fase gerak yang paling sesuai untuk analisis lutein adalah metanol-diklormetan (60:40) dengan kecepatan alir 2,1 ml/menit. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3.

3. Validasi metode analisis lutein

a. Uji presisi

Tiga konsentrasi larutan lutein yang telah dicobakan dimana dimulai dari konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi masing-masing 0,0456; 0,1368; 0,2280 µg/ml, memberikan nilai koefisien variasi berturut-turut 1,1971; 0,4767; 0,6958 %. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6.

b. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linieritas larutan standar lutein

Persamaan garis kurva kalibrasi yang didapat yaitu $y = 351,8941 + 87073,1018x$ dengan koefisien korelasi (r) adalah 0,9992. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 9 dan Tabel 4.

c. Pengukuran batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi lutein

Batas deteksi lutein yaitu sebesar 0,0094 µg/ml dan untuk batas kuantitasnya yaitu sebesar 0,0314 µg/ml. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.

d. Uji Perolehan Kembali lutein (akurasi)

Hasil rata-rata uji perolehan kembali lutein untuk simulasi I (80%), II (100%), dan III (120%), masing-masing 0,0912; 0,1140; 0,1368 µg/ml berturut-turut sebesar $(101,13 \pm 0,00060)\%$, $(98,90 \pm 0,00194)\%$, $(99,80 \pm 0,00151)\%$. Rata-rata uji perolehan kembali sebesar $(99,94 \pm$

0,00135)%). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 7. Lampiran 4 menunjukkan cara perhitungan persen perolehan kembali.

4. Analisis lutein pada sampel

Kadar lutein pada satu sampel suplemen makanan untuk kesehatan mata merk X yaitu berkisar antara 98,78% sampai 101,76% dan kadar-rata-rata sebesar $(100,60 \pm 0,00026)\%$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada gambar 11 dan tabel 8. Cara perhitungan persen kadar sampel dijelaskan pada lampiran 5.

B. PEMBAHASAN

Analisis lutein pada satu sampel suplemen makanan untuk kesehatan mata dengan merk X telah dilakukan secara kromatografi cair kinerja tinggi. Selama penelitian, penulis mengalami hambatan diantaranya adalah standar lutein yang didapat tidak murni hanya 5,4% dan merupakan bahan baku farmasi. Penulis mendapat kesulitan dalam mendapatkan standar lutein yang murni dikarenakan selain harganya yang sangat mahal tetapi juga harus menunggu (dipesan terlebih dahulu).

Standar lutein yang didapat berupa serbuk yang ter-*coating* berwarna kuning *orange*. Tujuan dari di *coating*-nya lutein ini dapat menjaga stabilitas lutein dan mempermudah dalam penyimpanannya tetapi *coating* ini mengganggu analisis maka dari itu untuk *coating*-nya harus dipecah sehingga didapatkan luteinnya saja. Lutein sifatnya yang mudah teroksidasi dan terurai

oleh cahaya dan panas maka selama penanganan luteinnya seminimal mungkin dihindari dari pengaruh tersebut yaitu menggunakan aluminium foil dan larutan induk lutein disimpan pada suhu rendah.

Untuk melepas lutein dari *coating*-nya maka dilakukan proses pengekstraksian. Standar lutein merupakan senyawa yang non-polar maka *coating*-nya bersifat polar (30) dan digunakan pelarut campuran untuk pengekstraksian berdasarkan kepolarannya. Metanol yang bersifat polar akan menarik lapisan *coating* yang bersifat polar, sedangkan etil asetat dan petroleum eter yang bersifat non-polar untuk menarik luteinnya yang bersifat non-polar.

Sebelum dilakukan optimasi dan validasi metode, dilakukan terlebih dahulu pencarian panjang gelombang maksimum lutein. Pada waktu pencarian panjang gelombang maksimum, lutein memberikan dua panjang gelombang yaitu di 475 nm dan 447 nm. Adanya dua panjang gelombang ini bukan karena lutein tercemar oleh adanya zat lain tetapi karena struktur ikatan rangkap terkonjugasi lutein yang khas sedemikian rupa sehingga menghasilkan kurva serapan pada daerah cahaya tampak (6) tetapi yang dipilih adalah 447 nm karena pada panjang gelombang tersebut memberikan serapan yang maksimum.

Setelah didapat panjang gelombang maksimum, lalu dilakukan optimasi fase gerak. Pemilihan kondisi berdasarkan literatur dan disesuaikan dengan peralatan yang tersedia dan telah dilakukan pendahuluan pemilihan fase gerak untuk memisahkan lutein dengan zeaxanthin dengan berbagai

macam fase gerak tetapi masih menghasilkan satu kromatogram yang tidak terpisah.

Fase gerak pertama yang dicobakan adalah metanol:diklormetan (70:30) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit. Metanol merupakan pelarut yang sangat murni, mudah diperoleh. Lutein yang bersifat non-polar akan terikat pada fase diam yang non-polar dengan adanya diklormetan, maka mempercepat waktu retensi dari lutein tetapi fase gerak ini menghasilkan kromatogram dengan dua puncak.

Dilakukan optimasi dengan menambah jumlah diklormetan menjadi metanol:diklormetan (60:40) dengan kecepatan alir yang sama tetapi menghasilkan kromatogram yang sama. Karena dengan merubah perbandingan tidak menghasilkan kromatogram yang satu kemudian dicoba dengan pemilihan fase gerak yang kedua yaitu asetoneitril-metanol-diklormetan (75:25:5). Dengan kecepatan alir 1ml/menit, kromatogram yang dihasilkan sama saja, terdapat dua puncak yang bertumpuk. Asetoneitril selain menghasilkan gambar kromatogram yang tidak satu harganya juga mahal pada saat dilakukan penelitian sehingga asetoneitril tidak digunakan sebagai fase gerak.

Dua puncak yang muncul ini disebabkan standar lutein sebagaimana dapat dilihat pada sertifikat analisa masih mengandung zeaxanthin yang merupakan isomer lutein (6). Karena kromatogram yang dihasilkan fase gerak metanol-diklormetan (60:40) lebih baik dibandingkan dengan perbandingan 70:30, v/v, maka fase gerak ini yang dioptimasi lagi dengan

cara mempercepat laju alir dan memperkecil konsentrasi larutan standar. Laju alir dipercepat menjadi 2,1 ml/menit dan didapatkan kromatogram dengan dua puncak yang terpisah sehingga dapat ukur satu puncak saja.

Waktu retensinya sebenarnya terlalu cepat tetapi tidak mengganggu analisis tetapi jika kecepatan alir tidak ditingkatkan maka kromatogram akan menghasilkan dua puncak sehingga menyulitkan analisis. Ketika dinaikkan menjadi 2,1 ml/menit dihasilkan kromatogram hanya satu puncak saja. Hanya saja waktu retensi semakin cepat dan membuat pompa naik tinggi tetapi tidak melebihi batas maksimum kapasitas pompa.

Validasi metode dilakukan sebelum melakukan analisis sampel. Validasi diawali dengan pembuatan kurva kalibrasi yang dibuat dengan menghubungkan luas puncak yang dihasilkan oleh sedikitnya lima konsentrasi standar yang berbeda. Pada metode ini, pembuatan kurva kalibrasi lutein dilakukan dengan menghubungkan enam titik pada berbagai konsentrasi. Konsentrasi yang ditentukan yaitu 0,0456; 0,0570; 0,0684; 0,1368; 0,1596; 0,2280 µg/ml.

Persamaan kurva kalibrasi merupakan hubungan antara sumbu x dan sumbu y. Deretan konsentrasi yang dibuat dinyatakan sebagai sumbu x, sedangkan luas puncak lutein yang diperoleh dari hasil pengukuran dinyatakan sebagai nilai sumbu y. Persamaan garis kurva kalibrasi lutein yang didapat adalah $y = 351,8941 + 87073,1018x$, dengan nilai koefisien korelasi 0,9992. Koefisien korelasi, r , yang semakin mendekati nilai 1

menyatakan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram yang dihasilkan.

Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung dengan menggunakan persamaan garis regresi linier kurva kalibrasi yang telah diperoleh. Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Berdasarkan perhitungan statistik, maka diperoleh batas deteksi lutein sebesar 0,0094 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan batas kuantitasi lutein sebesar 0,0314 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi tersebut berada dibawah konsentrasi terkecil pembuatan kurva kalibrasi.

Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif 2% atau kurang (12).

Pada penelitian ini telah dibuat tiga titik konsentrasi untuk penentuan presisi yaitu konsentrasi rendah, sedang, tinggi, masing-masing sebesar 0,0456; 0,1368; 0,2280 $\mu\text{g/ml}$. Dari ketiga konsentrasi tersebut simpangan baku relatifnya kurang dari 2% oleh karena itu analisis ini dapat disimpulkan memberikan nilai dengan keseksamaan yang baik.

Untuk menilai kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya dapat dilakukan melalui uji perolehan kembali yang bertujuan

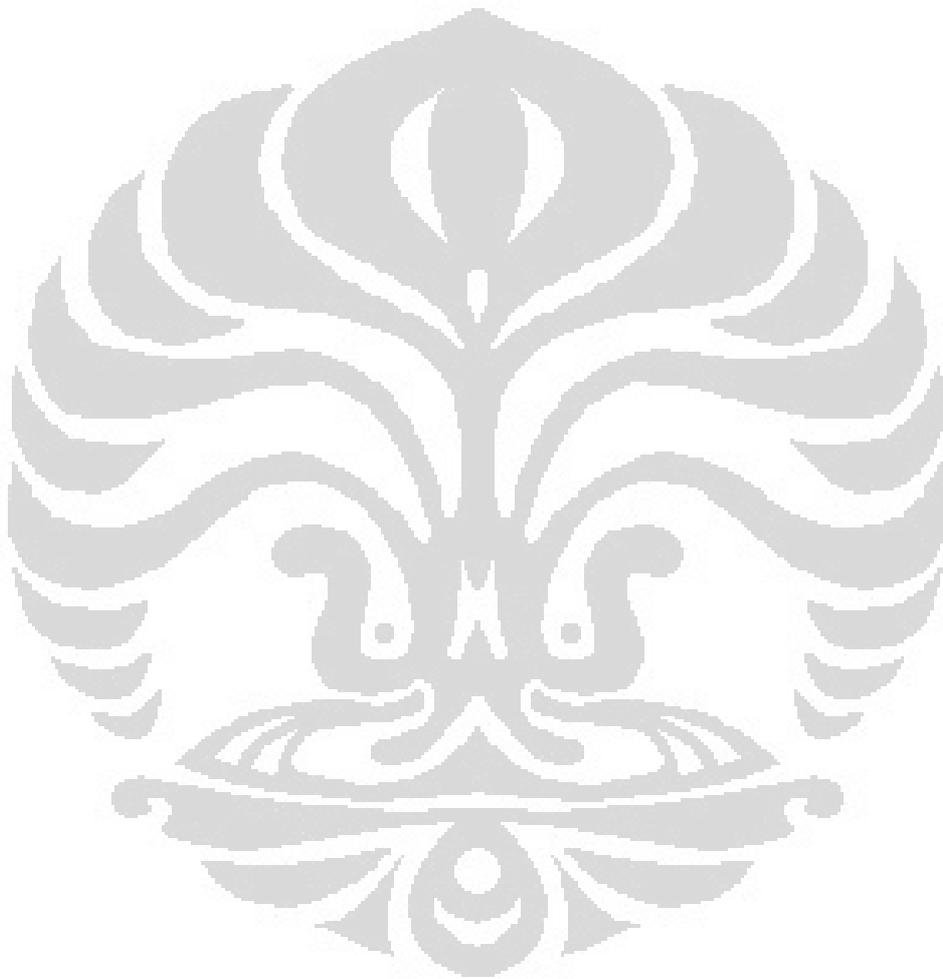
untuk mengetahui keakuratan metode yang digunakan. Uji perolehan kembali merupakan cara untuk menentukan kecermatan hasil analisis suatu metode. Kecermatan atau akurasi adalah kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Uji perolehan kembali dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu metode simulasi dan metode penambahan bahan baku.

Uji perolehan kembali dilakukan dengan membuat sebuah simulasi serbuk kaplet yang terdiri dari massa tablet campuran amilum dan talk (5%) (23) serta zat tambahan lain seperti vitamin C, vitamin E asetat, dan betakaroten serta penambahan zat aktif lutein dengan perbandingan yang sesuai dengan komposisi sampel tablet bermerk dagang. Alasan penggunaan amilum dan talk sebagai pengisi, penghancur, serta pelincir dalam pembuatan kaplet serta inert tidak bereaksi dengan zat lainnya (23). Amilum dan talk lazim digunakan sebagai bahan tambahan pembuatan tablet maupun tablet. Analisis uji perolehan kembali memberikan hasil yang baik sebesar 99,94% dimana tidak keluar dari rentang yang disyaratkan yaitu 98% - 102% untuk sediaan farmasi.

Sampel yang dipergunakan pada penelitian ini adalah satu jenis sampel suplemen makanan yang diperoleh dari apotek. Analisis dilakukan dengan melihat kromatogram yang muncul pada waktu retensi yang sama atau hampir sama dibandingkan dengan waktu retensi dari zat standar yang dipisahkan pada kondisi fase gerak dan kecepatan alir yang sama.

Hasil analisis pada satu sampel sediaan yang telah dihitung kadarnya didapatkan kadar dengan rentang antara 98,78% sampai 101,76% dan

kadar-rata-rata sebesar $(100,60 \pm 0,00026)\%$. Secara keseluruhan dari hasil percobaan kondisi yang diperoleh pada penelitian ini dapat dipakai untuk menganalisis lutein dalam sediaan suplemen makanan untuk kesehatan mata.



BAB V

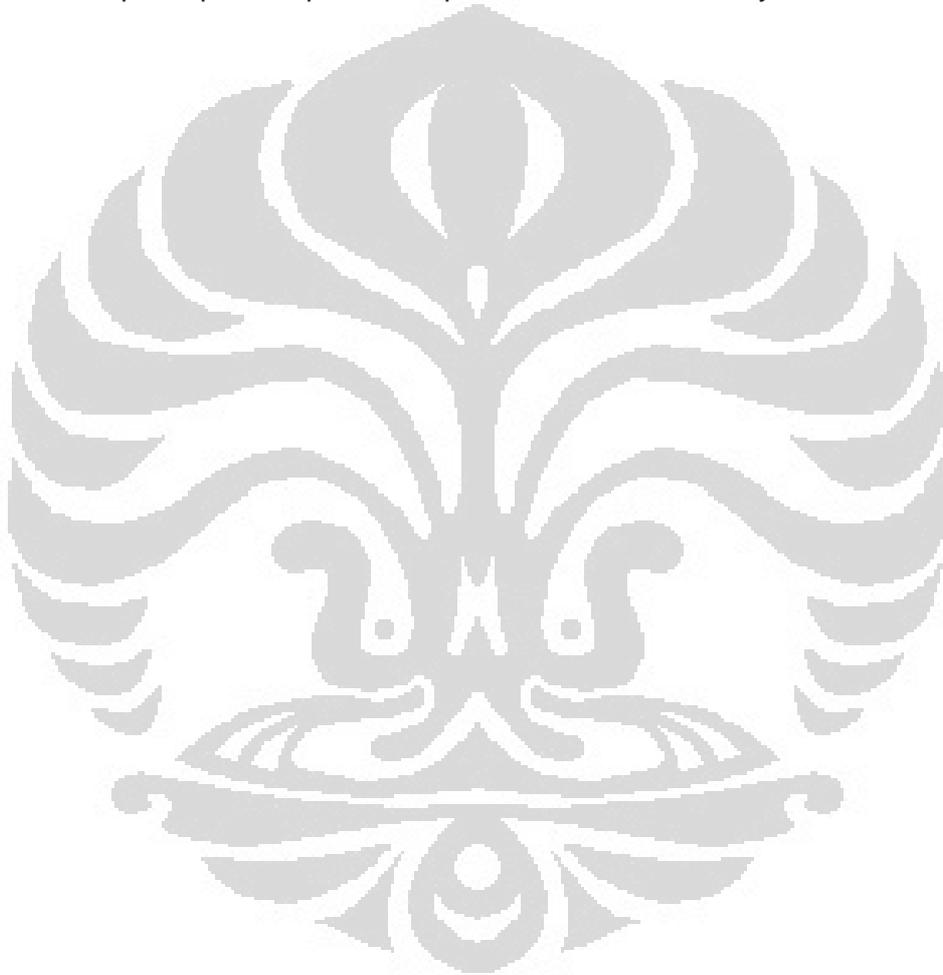
KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

- 1a. Kondisi analisis optimum untuk analisis lutein secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan kolom Kromasil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm) dan detektor visibel diperoleh dengan fase gerak metanol-diklormetan (60:40, v/v) dengan kecepatan alir 2,1 ml/menit pada panjang gelombang 447 nm.
- 1b. Hasil validasi metode yang dilakukan menunjukkan bahwa metode ini valid dengan hasil sebagai berikut:
 - Hasil uji presisi menunjukkan nilai koefisien variasi (KV) kurang dari 2%
 - Koefisien korelasi (r) sebesar 0,9992
 - Batas deteksi (LOD) sebesar 0,0094 µg/ml dan batas kuantitasi (LOQ) sebesar 0,0314 µg/ml
 - Rata-rata hasil uji perolehan kembali (akurasi) sebesar (99,94 ± 0,00135)%
2. Dari satu sampel yang dianalisis, kadar rata-rata lutein pada satu sampel suplemen makanan untuk kesehatan mata adalah (100,60 ± 0,00026)%.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencari kondisi lain yang dapat memisahkan lutein dan zeaxanthin.
2. Pada penelitian selanjutnya disarankan menganalisis lutein dan zeaxanthin pada produk-produk suplemen makanan lainnya.



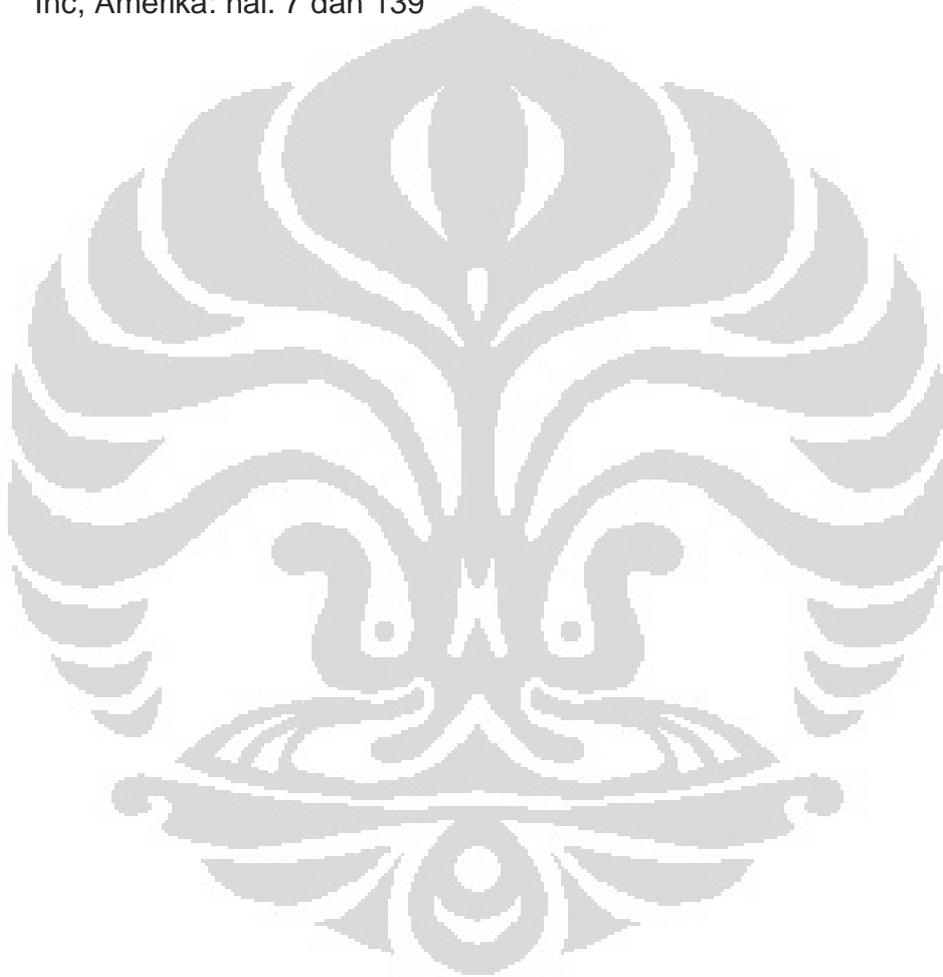
DAFTAR ACUAN

1. Badan Pengawas Obat dan Makanan RI. 2005. *Keputusan Kepala Badan Pengawas Badan Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.23.3644 Tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan*. Diakses dari http://www.pom.go.id/public/hukum_perundangan/pdf/final%20kep_lampiran.pdf, 30 Desember 2008, pk. 09.05.
2. Atmosukarto, K., Mitri R. 2003. Mencegah Penyakit Degeneratif Dengan Makanan. *Cermin Dunia Kedokteran*. **140**: 41
3. Anonim. 2008. Tinggalkan ECCE Andalkan PHACO. *Majalah Farmacia* . **7(9)**: 66
4. Ganjar, Ibnu Galib, Rohman, Abdul. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta: hal. 379-411.
5. Windholz, M. 1976. *The Merck Index Ninth Edition: An Encyclopedia of Chemical and Drugs*. Merck & Co., Inc. Rahway, N. J., USA: hal. 1120
6. Rodriguez-Amaya & Delia B. 2001. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. ILSI Press, USA: hal. 1-27
7. Moldrem, K. I., Jialiang Li, Phillip W. S., & Sherry A. 2004. Tanumihardjo. Lutein and β -carotene from Lutein-containing Yellow Carrot are Bioavailable in Humans. *Am J Clin Nutr*. **80(1)**: 131-136
8. Chitchumroonchokchai, C., Steven J. S., & Mark L. F. 2004. Assessment of Lutein Bioavailability from Meals and A Supplement Using Simulated Digestion and CACO-2 Human Intestinal Cells. *J Nutr*. **134(9)**: 2280-2394
9. Schupp, C., Estibaliz O-M., Christina G. , Brian M., Carrol E. C., & Jhon S W. 2004. Lutein, Zeaxanthin, Macular Pigment, and Visual Function in Adult Cystic Fibrosis Patients. *Am J Clin Nutr*. **79 (6)**: 1045-1052

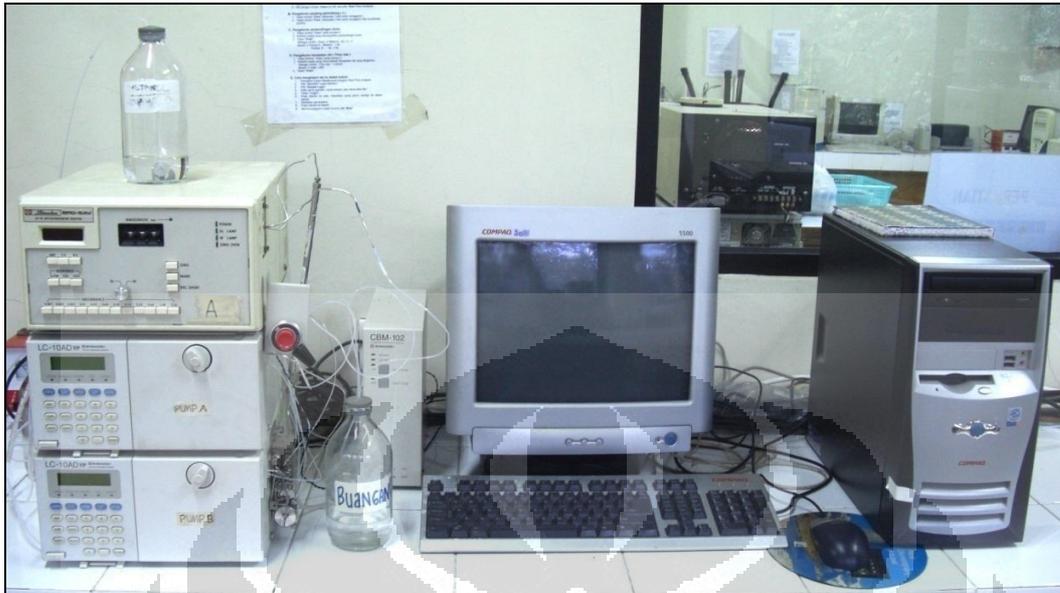
10. Bone A., Richard, J. T. L., Luis H. G. & Camilo A. Ruiz. 2003. Lutein and Zeaxanthin Dietary Supplements Raise Macular Pigment Density and Serum Concentration of These Carotenoid in Humans. *J Nutr*: **133**(4): 992-997
11. Anonim. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta: hal. 1009.
12. Harmita. 2006. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok: hal. 101-143
13. Johnson, E.L., & R. Stevenson. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Terjemahan: K. Padmawinata. Penerbit ITB, Bandung: hal. 2-15 dan 213-321
14. Evans, Gary. 2004. *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. CRC Press, New York: hal. 250
15. Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. **1**(3): 117-135.
16. Moreau, A. R., David B. J., Kevin B. H. 2007. A Comparison of The Levels of Lutein and Zeaxanthin in Corn germ Oil, Corn Fiber Oil and Corn Kernel Oil. *J Am Oil Chem Soc*. **84**(11): 1039-1044
17. Reza, M., Lornejad-Schafer, Christine E. B., Hans K. B., Juergen F. 2007. Solubility, Uptake and Biocompatibility of Lutein and Zeaxanthin Delivered to Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells in Tween40 Micelles. *Eur J Nutr*. **1**(1): 79-86
18. Sommerburg, O., Jan. E e. K., Alan C. B., Frederick J. G. M. VK. 1998. Fruits and Vegetables that are Sources for Lutein and Zeaxanthin: Macular Pigment in Human Eyes. *Br J Ophthalmol*. **82**: 907-910
19. Gill, B.D. & Harvey E. I. 2008. Liquid Chromatographic Method for Determination of Lutein in Milk and Pediatric Formulas. *Inter Dairy J*. **18**: 894-898

20. Sowell, A. L., D. L. Huff, P. R. Y., Samuel P. C., & Elaine W. G. 1994. Retinol, α -tocopherol, Lutein/Zeaxanthin, β -cryptoxanthin, Lycopene, α -caroten, Trans- β -carotene, and Four Retinyl Esters in Serum Determined Simultaneously by Reversed-phase HPLC with Multiwaveleght Detection. *Clin Chem.* **40**(3): 411-416
21. Breithaup, D. E., Jorg Schlatter. 2005. Lutein and Zeaxanthin in New Dietary Supplements-analysis and Quantification. *Eur Foods Res Technol.* **220**:648-652
22. Gale, C. R., Nigel F. H., David I. W. P. & Christopher N. M. 2003. Lutein and Zeaxanthin Status and Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* **44**(6): 2461-2465
23. Wade, A. & Paul J. W. (Editor). 1994. *Handbook of Pharmaceutical of Pharmaceutical Excipient, Second Edition.* American Pharmaceutical Association, Washington: hal. 483-488 dan 419-421
24. Khachk, F., & Beltsville. 1995. Process for Isolation, Purification, and Recrystallization of Lutein From Saponified Marigold Oleoresin and Uses Thereof. *United States Patent.*
25. Handelman, G. J., Zachary D. N., Alice H Lichtenstein, Ernst J S. & Jeffrey B Blumberg. 1999. Lutein and Zeaxanthin Concentration in Plasma After Detary Supplementation With Egg Yolk. *Am J Clin Nutr.* **70**: 247-251
26. Goodrow, E. F., Thomas A. W., Susan C. H., Robini V., Patrick A. S., Garry H., & Robert J. N. 2006. Consumption of One Egg per Day Increases Serum Lutein and Zeaxanthin Concentration in Older Adults Without Altering Serum Lipid and Lipoprotein Cholesterol Concentration. *J Nutr.* 2519-2524
27. Losso, J. N., Eudokia M., Joan M. K. 2008. *Isolation of Aflatoxin-free Lutein from Aflatoxin-contiminated Plants and Plant Products.* The United States Patent and Trademark Office (USPTO). Diakses dari: <http://www.freshpatents.com>, 28 Februari 2009, pk. 13.50.

28. Young, A. & George B. 1993. *Carotenoids in Photosynthesis*. Chapman & Hall, London: hal. 1-6 dan 410-412
29. Mason, P. 2007. *Dietary Supplements: Third Edition*. Pharmaceutical Press, New York: hal: xi
30. McMaster, M. C.1994. *HPLC: A Practical User's Guide*. VCH Publishers, Inc, Amerika: hal. 7 dan 139







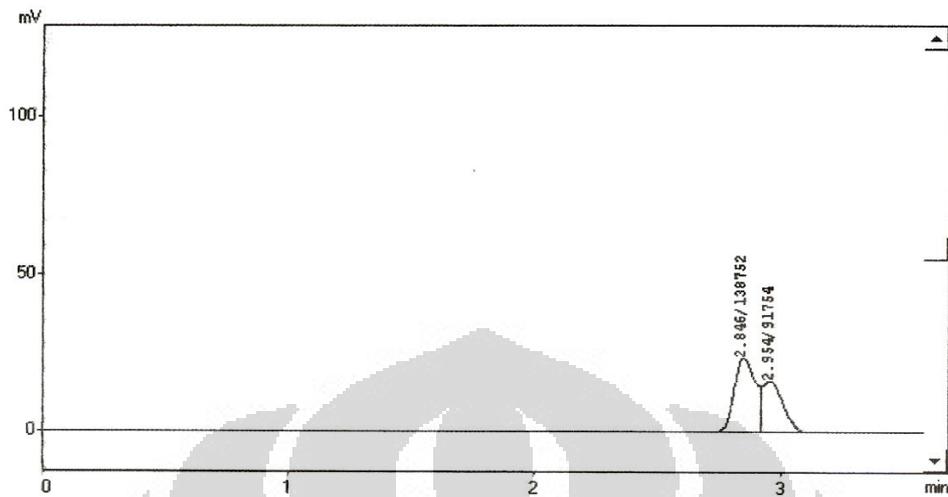
Gambar 3. Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Keterangan:

1. Pompa LC-10AD (Shimadzu)
2. Injektor Rheodyne
3. Kolom Kromasil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm)
4. Detektor SPD-5AV (Shimadzu)
5. Komputer Class LC-10
6. Integrator CBM-102 (Shimadzu)
7. Botol fase gerak



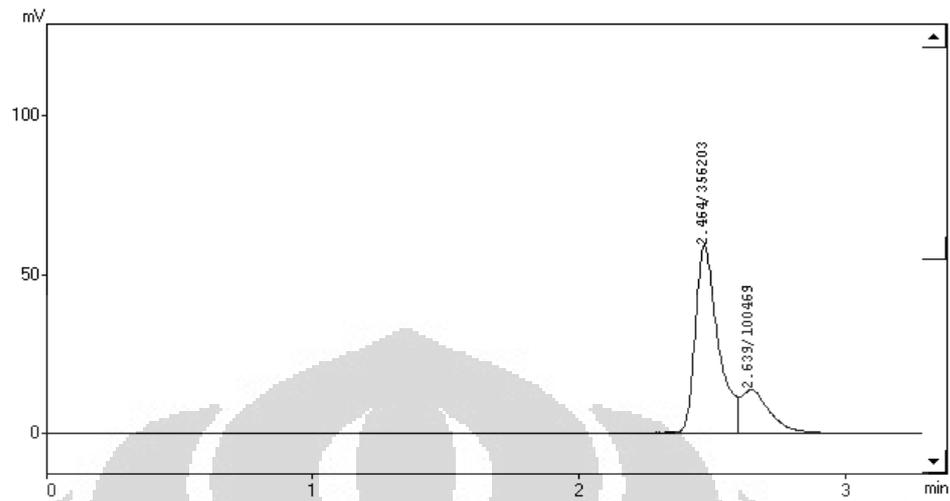
Gambar 4. Spektrum serapan larutan standar lutein 1,1400 $\mu\text{g/ml}$ dalam fase gerak metanol-diklorometan (60:40)



Gambar 5. Kromatogram larutan standar lutein 1,1400 $\mu\text{g/ml}$ dalam fase gerak metanol-diklormetan (70:30)

Kondisi:

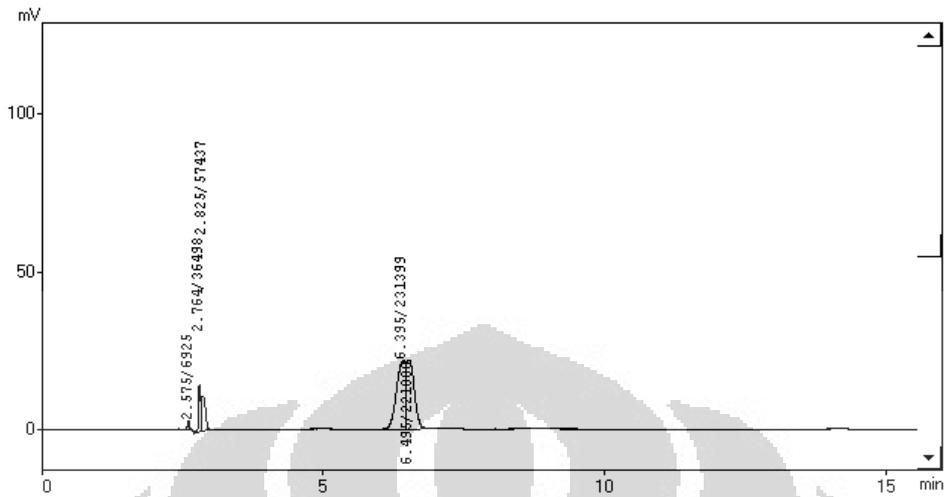
Kolom Kromasil TM LC-18 (25 cm x 4,6 mm); fase gerak metanol-diklormetan (70:30); kecepatan alir 1,0 ml/menit; volume penyuntikan 20,0 μL ; panjang gelombang 447 nm



Gambar 6. Kromatogram larutan standar lutein 2,2800 $\mu\text{g/ml}$ dalam fase gerak metanol-diklorometan (60:40)

Kondisi:

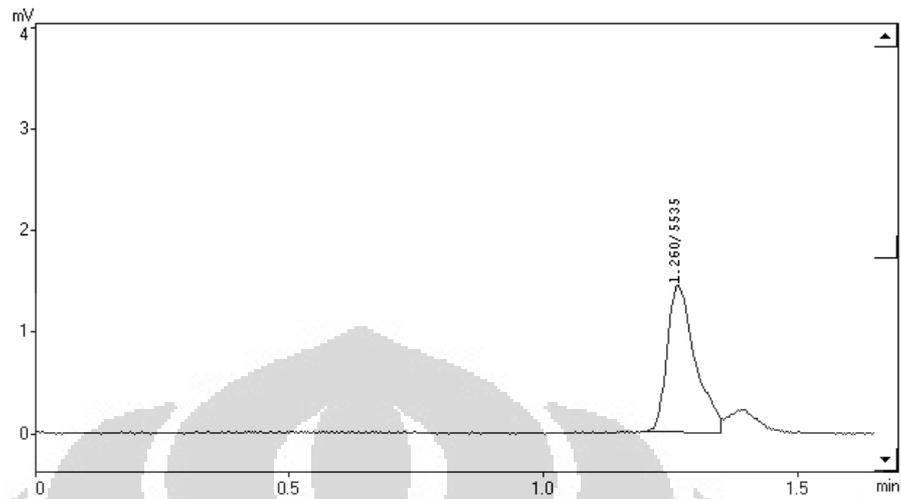
Kolom Kromasil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm); fase gerak metanol-diklorometan (60:40); kecepatan alir 1,0 ml/menit; volume penyuntikan 20,0 μL ; panjang gelombang 447 nm



Gambar 7. Kromatogram larutan standar lutein 2,2800 $\mu\text{g/ml}$ dalam fase gerak asetonitril-metanol-diklormetan (75:20:5)

Kondisi:

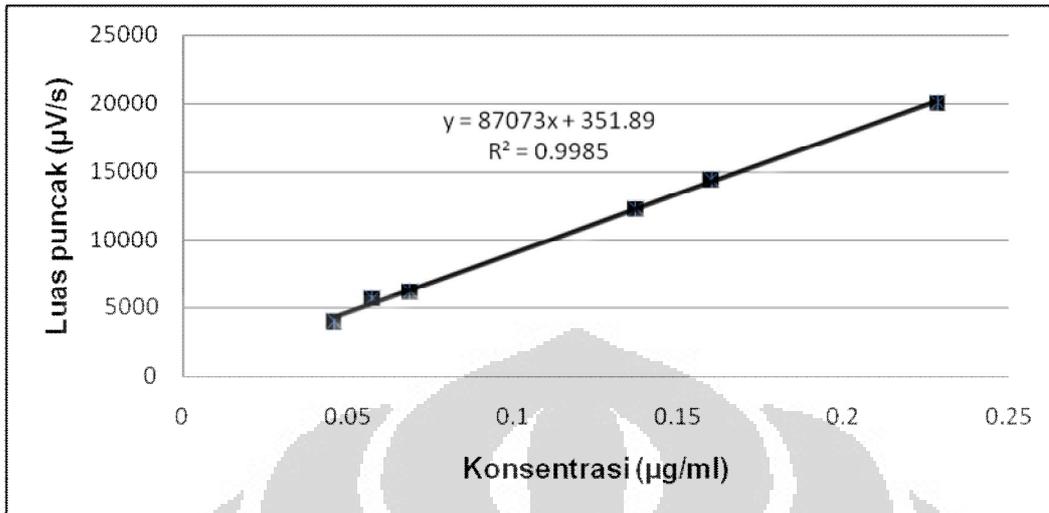
Kolom Kromasil TM LC-18 (25 cm x 4,6 mm); fase gerak asetonitril-metanol-diklormetan (75:20:5); kecepatan alir 1,0 ml/menit; volume penyuntikan 20,0 μL ; panjang gelombang 447 nm



Gambar 8. Kromatogram larutan standar lutein 0,0570 µg/ml dalam fase gerak metanol-diklormetan (60:40)

Kondisi:

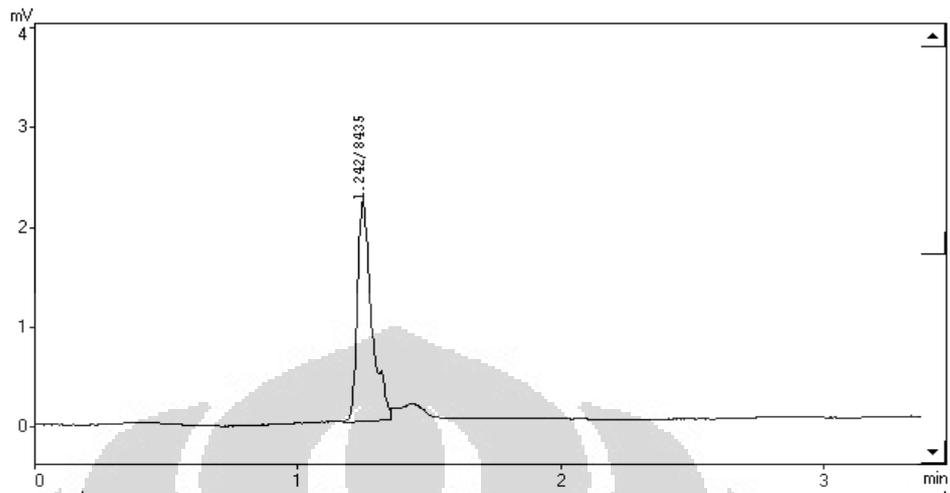
Kolom Kromasil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm); fase gerak metanol-diklormetan (60:40); kecepatan alir 2,1 ml/menit; volume penyuntikan 20,0 µL; panjang gelombang 447 nm



Gambar 9. Kurva kalibrasi lutein

Keterangan:

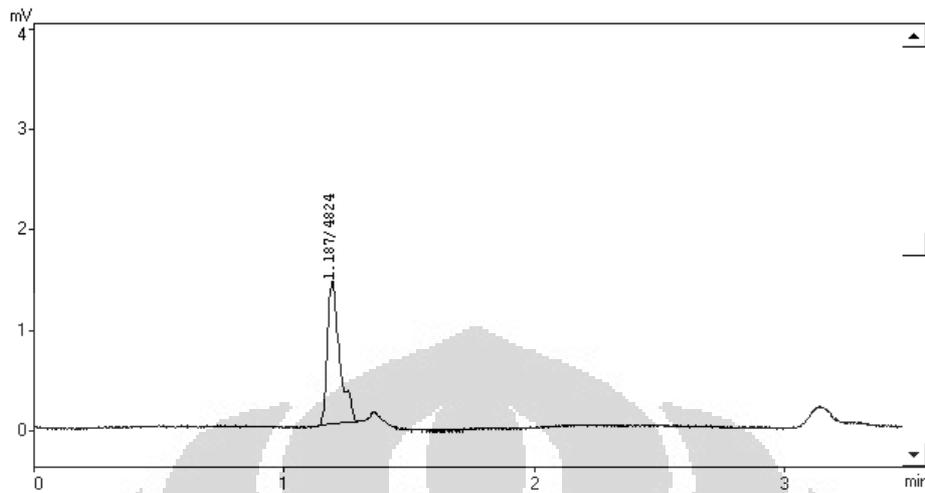
Persamaan kurva kalibrasi lutein: $y = 351,8941 + 87073,1018x$ dengan koefisien korelasi (r) = 0,9992



Gambar 10. Kromatogram uji perolehan kembali secara simulasi dengan konsentrasi larutan lutein 0,0912 $\mu\text{g/ml}$ dalam fase gerak metanol-diklormetan (60:40)

Kondisi:

Kolom Kromasil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm); fase gerak metanol-diklormetan (60:40); kecepatan alir 2,1 ml/menit; volume penyuntikan 20,0 μL ; panjang gelombang 447 nm



Gambar 11. Kromatogram sampel suplemen makanan untuk kesehatan mata dengan merk X dengan konsentrasi pengukuran 0,0517 $\mu\text{g/ml}$

Kondisi:

Kolom Kromasil TM LC-18 (25 cm x 4,6 mm); fase gerak metanol-diklormetan (60:40); kecepatan alir 2,1 ml/menit; volume penyuntikan 20,0 μL ; panjang gelombang 447 nm



TABEL 1

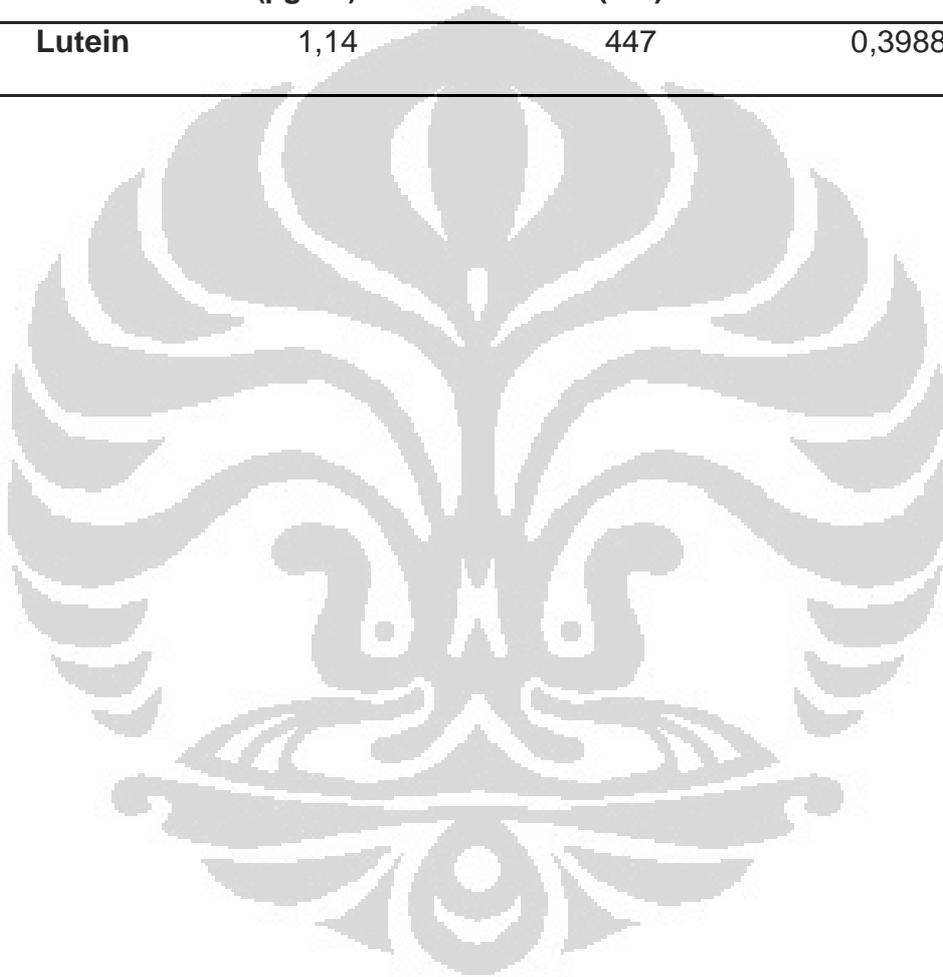
Kelarutan lutein dalam berbagai macam pelarut [27]

Pelarut	mg/L
air	Tidak larut
Aseton	800
Etil asetat	800
Benzena	600
Kloroform	6000
Sikloheksan	50
Sikloheksanon	4000
Dimetil formamid	1000
Etil alkohol	300
Asetonitril	100
Etil eter	2000
Hexane	20
2-propanol	400
Metil alkohol	200
MTBE	2000
THF	8000
Toluen	500

TABEL 2

Panjang gelombang dan serapan lutein

Nama Zat	Konsentra si ($\mu\text{g/ml}$)	Panjang gelombang maksimum (nm)	Serapan maksimu m
Lutein	1,14	447	0,3988



TABEL 3
Pemilihan Kondisi Analisis Optimum Untuk Analisis Lutein

Komposisi Fase gerak	Kec. alir (ml/menit)	Lutein			HETP
		Waktu Retensi (menit)	Faktor ikutan	Jumlah lempeng teoritis (plat)	
Metanol-diklormetan (70:30)	1,0	2,846	Terdapat dua puncak		
Metanol-diklormetan (60:40)	1,0	2,446	Terdapat dua puncak		
	2,1	1,260	1,28	1324,96	0,0188
Asetonitril-metanol-diklormetan (75:20:5)	1,0	6,395	Terdapat dua puncak		

TABEL 4

Hasil pengukuran standar lutein untuk pembuatan kurva kalibrasi

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Luas puncak ($\mu\text{V/s}$)
0,0456	3994
0,0570	5683
0,0684	6218
0,1368	12250
0,1596	14432
0,2280	20085

Persamaan garis kurva kalibrasi : $y = 351,8941 + 87073,1018x$
 $r = 0,9992$

Kondisi:

Kolom Kromasil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm); fase gerak metanol-diklormetan (60:40); kecepatan alir 2,1 ml/menit; volume penyuntikan 20,0 μL ; panjang gelombang 447 nm

TABEL 5

Perhitungan secara statistik untuk menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi lutein

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Luas puncak ($\mu\text{V/s}$)	Y_i	$(y-y_i)^2$
0,0456	3994	4322,4295	107864,6504
0,0570	5683	5315,0609	135379,1795
0,0684	6218	6307,6942	8045,0608
0,1368	12250	12263,4944	182,0995
0,1596	14432	14248,7611	33576,4771
0,2280	20085	20204,5613	14294,9069
Jumlah			299342,3741

$S(y/x)$ = 273,5609
 Batas deteksi (LOD) = 0,0094 $\mu\text{g/ml}$
 Batas kuantitasi (LOQ) = 0,0314 $\mu\text{g/ml}$

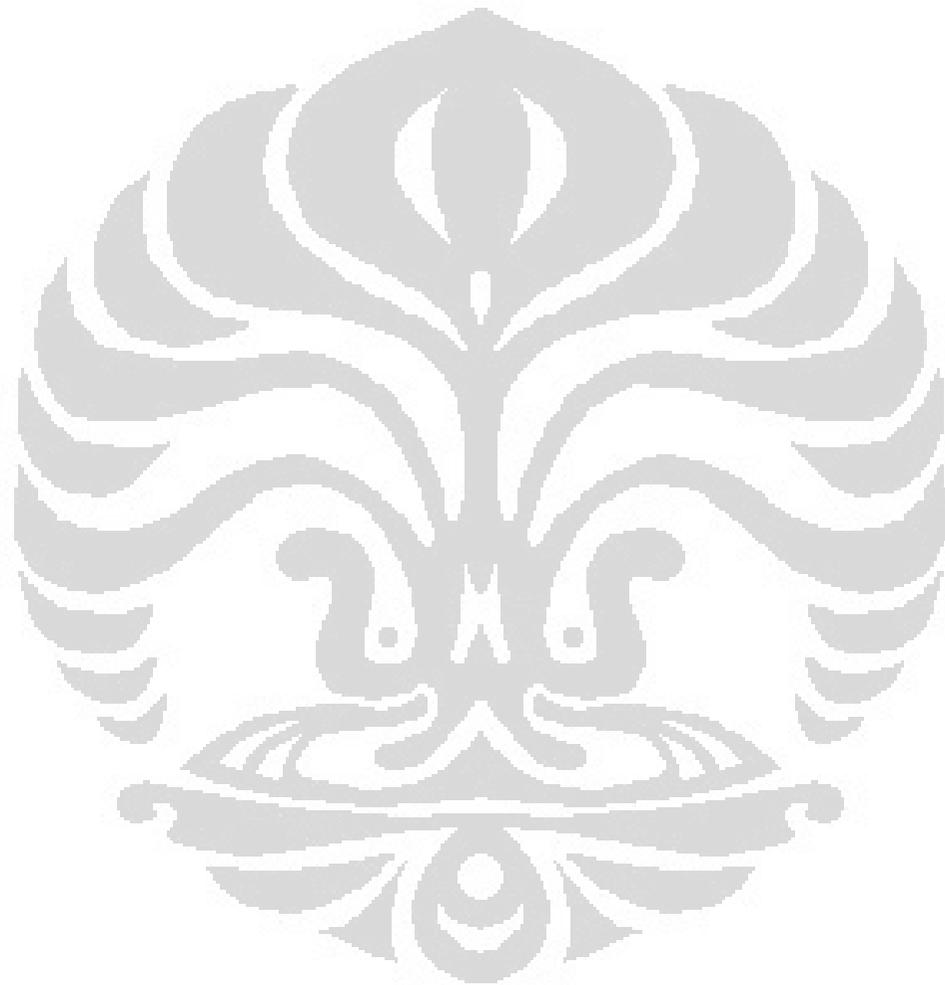
TABEL 6

Hasil pengukuran standar lutein untuk data presisi

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Luas puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi pengukuran ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi rata-rata ($\mu\text{g/ml}$)	Simpangan Baku	Koefisien Variasi (%) (KV)
0,0456	3994	0,0418	0,0416	0,000151	0,3629
	3999	0,0419			
	3984	0,0417			
	3962	0,0414			
	3899	0,0407			
	4019	0,0421			
0,1368	12250	0,1366	0,1362	0,000649	0,4758
	12293	0,1371			
	12192	0,1359			
	12267	0,1368			
	12149	0,1354			
	12187	0,1359			
0,2280	20064	0,2263	0,2261	0,001574	0,6961
	20085	0,2266			
	20235	0,2283			
	19998	0,2256			
	19821	0,2235			
	20089	0,2266			

Kondisi:

Kolom Kromasil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm); fase gerak metanol-diklorometan (60:40); kecepatan alir 2,1 ml/menit; volume penyuntikan 20,0 μL ; panjang gelombang 447 nm



TABEL 7
 Hasil Uji Perolehan Kembali Lutein

Range Konsentrasi yang dibuat (%)	Konsentrasi lutein yang disuntikkan (µg/ml)	Lutein yang diperoleh		Persentase Uji Perolehan Kembali (%)	Rata-rata Uji Perolehan Kembali (%)	
		Luas Puncak UPK (µV/s)	Konsentrasi UPK (µg/ml)			
80	0,0912	8435	0,0928	101,79	101,13	0,0
		8385	0,0922	101,16		
		8328	0,0916	100,44		
100	0,1140	10163	0,1126	98,84	98,89	0,0
		10073	0,1164	98,00		
		10260	0,1138	99,82		
120	0,1368	12119	0,1351	98,79	99,80	0,0
		12220	0,1363	99,63		
		12382	0,1381	100,99		

Rata-rata uji perolehan kembali = $(99,94 \pm 0,00135) \%$

Kondisi:

Kolom Kromasil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm); fase gerak metanol-diklormetan (60 ml/menit; volume penyuntikan 20,0 µL; panjang gelombang 447 nm

TABEL 8
Data kadar lutein dalam sampel

Berat yang ditimbang (mg)	Luas puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi yang didapat ($\mu\text{g/ml}$)	Kadar (%)	SD	KV (%)	Kadar rata-rata (%) \pm SD
50,10	4899	0,0522	99,05	0,000321	0,617	98,80 \pm 0,000321
	4824	0,0517	98,10			
	4911	0,0523	99,24			
53,40	5281	0,0566	100,62	0,000360	0,6315	101,23 \pm 0,000360
	5325	0,0571	101,52			
	5327	0,0573	101,56			
53,80	5379	0,0577	101,76	0,0001	0,1733	101,76 \pm 0,0001
	5368	0,0576	101,59			
	5385	0,0578	101,94			

Kadar rata-rata \pm SD: (100,60 \pm 0,00026)%

Keterangan:

SD = standar deviasi

Dalam satu kaplet, berat lutein = 2 mg

Kondisi:

Kolom Kromasil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm); fase gerak metanol-diklormetan (60:40); kecepatan alir 2,1 ml/menit; volume penyuntikan 20,0 μL ; panjang gelombang 447 nm

LAMPIRAN



Lampiran 1

Cara Memperoleh Persamaan Garis Linier

Persamaan garis $y = a + bx$

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

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

Lampiran 2

Cara Perhitungan Simpangan Baku dan Koefisien Variasi

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

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

$$\text{Koefisien Variasi : } KV = \frac{SB}{\bar{x}} \times 100\%$$

Contoh :

Hasil pengukuran standar lutein untuk data presisi:

Konsentrasi rata-rata (\bar{x}) = 0,0416 $\mu\text{g/mL}$.

$$SB = 0.0001510$$

$$KV = \frac{0.0001510}{0,0416} \times 100\% \\ = 0.3629 \%$$

Lampiran 3

Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi :

Batas kuantitasi :

Contoh :

Persamaan kurva kalibrasi lutein : $y = 351,8941 + 87073,1018x$

$S(y/x) =$

$= 273,5609$

Batas deteksi likopen : LOD =

Batas kuantitasi likopen : LOQ =

Lampiran 4

Cara perhitungan uji perolehan kembali

Dari persamaan kurva kalibrasi lutein dicari nilai x:

$$y = 351,8941 + 87073,1018x$$

Keterangan:

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

x = konsentrasi lutein ($\mu\text{g/ml}$)

Lalu dimasukkan ke dalam rumus:

$$\% \text{ upk} = \frac{\text{Kadar hasil analisis (x)}}{\text{Kadar sesungguhnya}} \times 100\%$$

Konsentrasi lutein yang disuntikkan (kadar sesungguhnya) = $0,0912 \mu\text{g/ml}$

Luas puncak lutein larutan upk = $8435 \mu\text{V/s} \rightarrow x = 0,0928 \mu\text{g/ml}$

Persen perolehan kembali:

$$\% \text{ upk} = \frac{0,0928 \mu\text{g/ml}}{0,0912 \mu\text{g/ml}} \times 100\%$$

$$\% \text{ upk} = 101,7886 \%$$

Lampiran 5

Cara perhitungan kadar lutein dalam sampel

Persamaan kurva kalibrasi lutein

$$y = 351,8941 + 87073,1018x$$

Keterangan:

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

x = konsentrasi lutein ($\mu\text{g/ml}$)

$$\text{Kadar} = \frac{C_u}{C_p} \times 100\%$$

Cu : Konsentrasi yang diperoleh dari pengukuran kurva kalibrasi

Ce : Konsentrasi berdasarkan etiket pada kemasan

Contoh:

Konsentrasi lutein (hitungan berdasarkan etiket) = $0,0527 \mu\text{g/ml}$

Luas puncak lutein yang didapat (dihitung dari kurva kalibrasi) :

$$= 4899 \mu\text{V/s} \rightarrow x = 0,0522 \mu\text{g/ml}$$

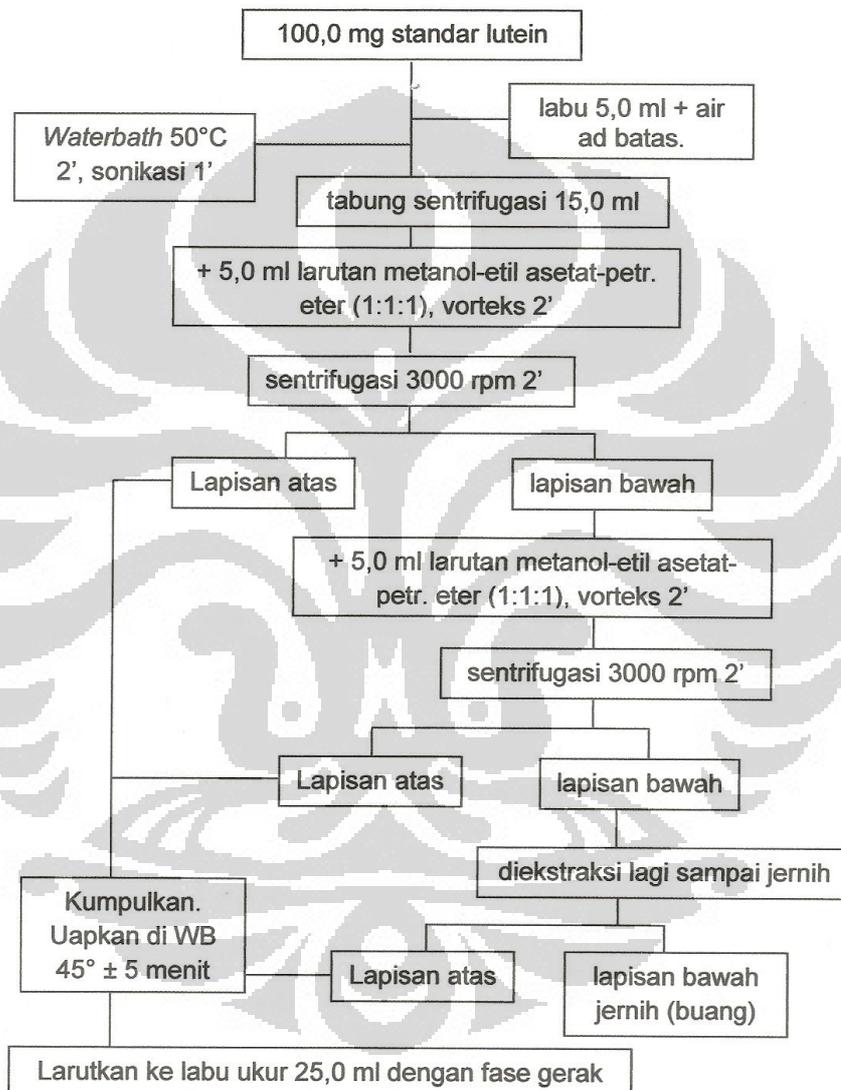
Persen kadar sampel:

Kadar:

$$= \frac{0,0522}{0,0527} \times 100\%$$

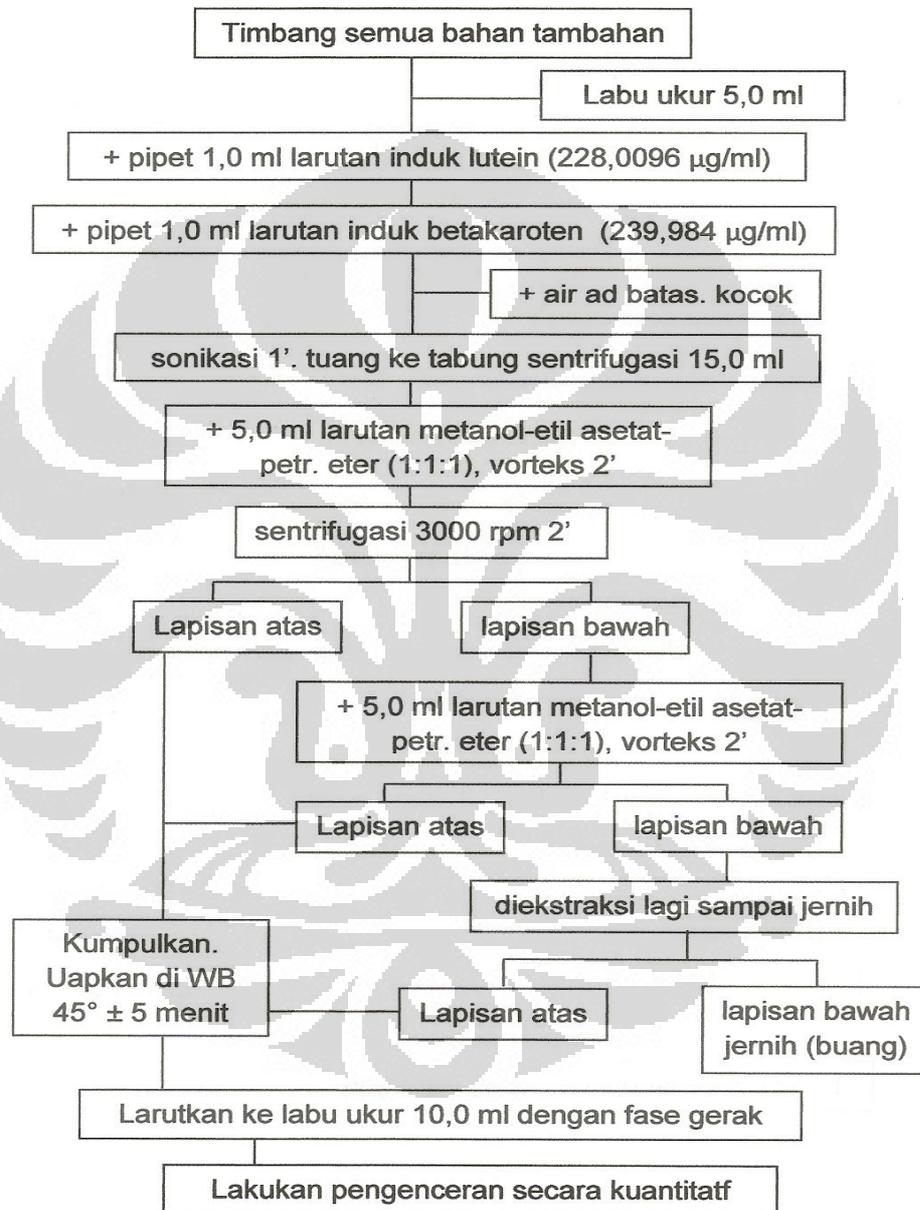
$$= 99,0512\%$$

Lampiran 6
Bagan Ekstraksi Standar Lutein

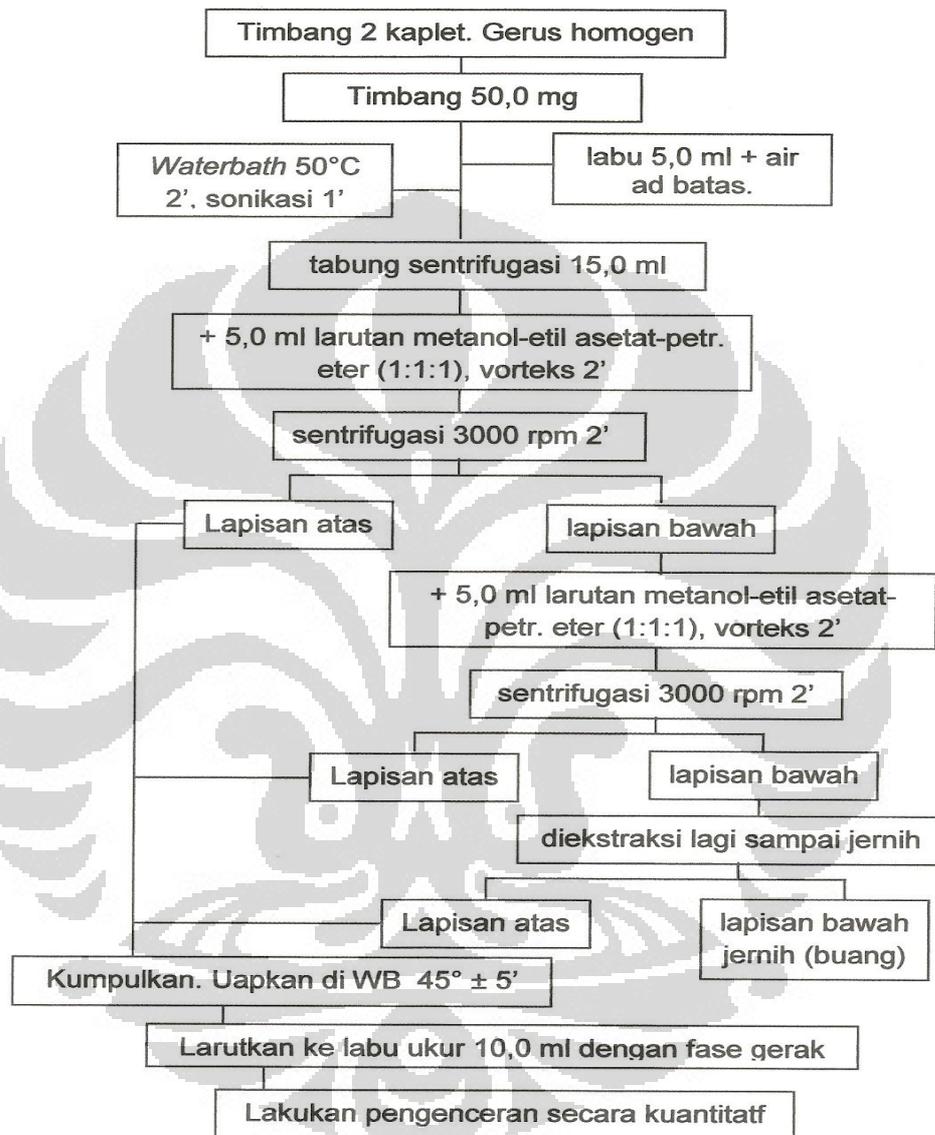


Lampiran 7

Bagan Ekstraksi Uji Perolehan Kembali 100%



Lampiran 8
Bagan Ekstraksi Sampel



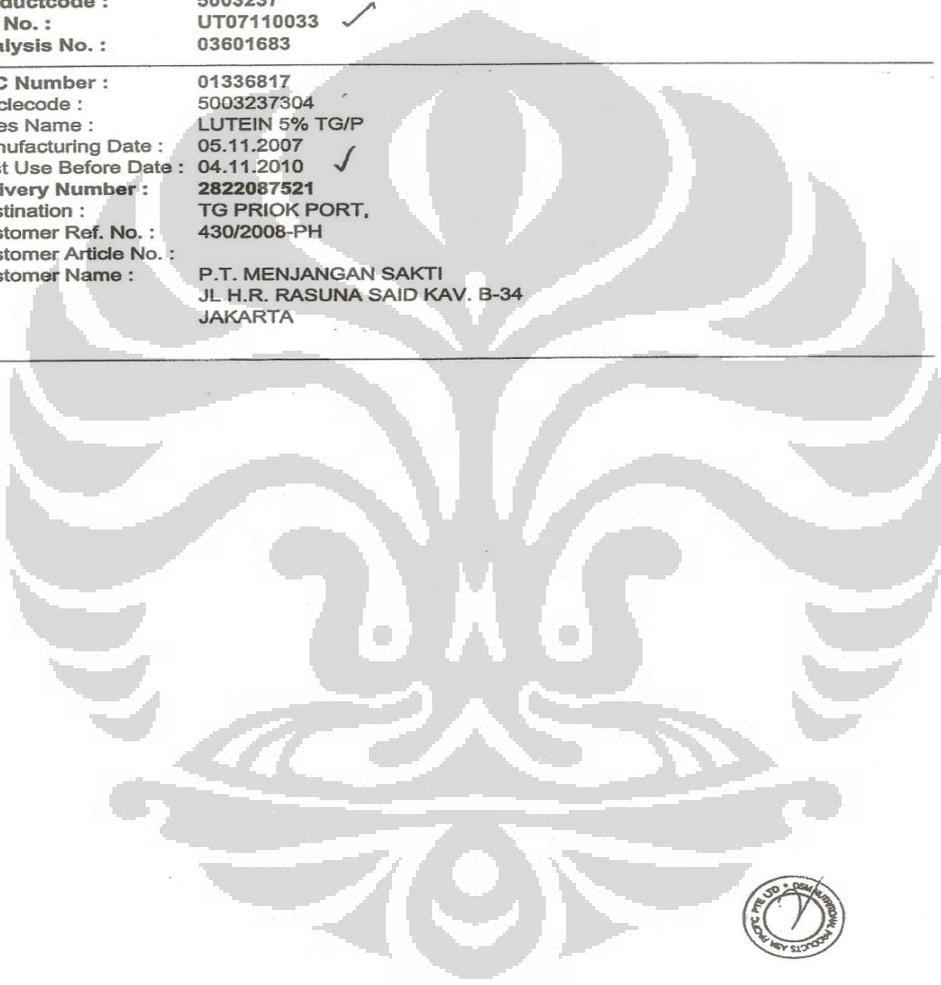
Lampiran 9

Sertifikat Analisis Lutein

LUTEIN 5% TG/P
COVERSHEET FOR CERTIFICATE OF ANALYSIS

Productcode : 5003237
Lot No. : UT07110033 ✓
Analysis No. : 03601683

CFC Number : 01336817
Articlecode : 5003237304
Sales Name : LUTEIN 5% TG/P
Manufacturing Date : 05.11.2007
Best Use Before Date : 04.11.2010 ✓
Delivery Number : 2822087521
Destination : TG PRIOK PORT,
Customer Ref. No. : 430/2008-PH
Customer Article No. :
Customer Name : P.T. MENJANGAN SAKTI
JL H.R. RASUNA SAID KAV. B-34
JAKARTA



DSM Nutritional Products Asia Pacific Pte. Ltd.
78 Shenton Way, Unit 21-01
Singapore 079120

Date of issue: 11-Jul-2008

Lampiran 10

Sertifikat Analisis Lutein (lanjutan)

CERTIFICATE OF ANALYSIS			
Productcode : 5003237			
Lot No. : UT07110033			
Analysis No. : 03601683			
Test	Result	Limits / Specifications	Dimension / Units
Appearance	free-flowing particles		
Colour	reddish		
Fineness (US standard sieves):			
- through sieve No. 20	100	100 to 100	%
- through sieve No. 40	95	min. 85	%
- through sieve No. 100	1	max. 15	%
Loss on drying	7	max. 8	%
Heavy metals	<10	max. 10	ppm
Arsenic	<3	max. 3	ppm
Lutein content	5.4	min. 5	%
Zeaxanthin content	0.47	min. 0.25	%
Microbiological purity	corresponds		
This lot was analysed and released by our authorized Quality Control Department and was found to meet the specifications as given above.			
DSM Nutritional Products Ltd The Quality Assurance Manager			
			
Gaessler Martina			
DSM Nutritional Products Ltd Branch Site Sisseln Quality Management CH-4334 Sisseln		Date of issue : 19-Nov-2007	
		Page 1 / 1	

Lampiran 11

Sertifikat Analisis Vitamin E asetat

Lampiran 12

Sertifikat Analisis Betakaroten



BETATAB 20%



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Productcode : 0435546
Lot No. : UT07070026
Analysis No. : 03582944

Test	Result	Limits / Specifications	Dimension / Units
Appearance	free-flowing particles		
Colour	reddish-brown		
Fineness (US standard sieves):			
- through sieve No. 20	100	100 to 100	%
- through sieve No. 40	94	min. 85	%
- through sieve No. 100	1	max. 15	%
Loss on drying	6	max. 8	%
Heavy metals	<10	max. 10	ppm
Arsenic	<3	max. 3	ppm
Beta-Carotene content	21.2	min. 20	%
Microbiological purity	corresponds		

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

DSM Nutritional Products Ltd
The Quality Assurance Manager

Gaessler Martina

DSM Nutritional Products Ltd
Branch Site Sisseln
Quality Management
CH-4334 Sisseln

Date of Issue : 07-Aug-2007

Page 1 / 1

Lampiran 13

Sertifikat Analisis Vitamin C



石药集团 维生药业 (石家庄) 有限公司

SHIJIAZHUANG PHARMA WEISHENG PHARMACEUTICAL (SHIJIAZHUANG) CO., LTD.

Certificate of Analysis

Product: Ascorbic Acid ✓ Analysis Standard: BP2005/USP29
 Batch No: 08087300 ✓ Quantity: 1000kgs
 Manufacturing Date: AUG 29, 2008 Expiry Date: AUG, 24, 2011 ✓

Item	Analysis Standard	Result
Characteristics	White Crystalline Power	Pass
Identification	Positive Reaction	Pass
Melting Point	≈ 190°C	191.0°C
Heavy Metal	≤ 10ppm	< 3ppm
PH	2.1-2.6	2.30
Clarity of Solution	Pass	Pass
Color of Solution	≤ BY ₇	< BY ₇
Oxalic Acid	≤ 0.2%	< 0.2%
Copper	≤ 5ppm	< 5ppm
Iron	≤ 2ppm	< 2ppm
Arsenic	≤ 3ppm	≤ 3ppm
Specific Rotation	+20.5° ~ +21.5°	+21.1°
Assay	99.0~100.5%	99.80%
Sulfated Ash	≤ 0.1%	0.04%
Organic Volatile Impurities	Meets Requirement	Pass

Result: The above product complies with BP2005/USP29 standard.

Manufacturer: Shijiazhuang Pharma. Weisheng Pharmaceutical (Shijiazhuang) Co., Ltd.

石药集团 维生药业 (石家庄) 有限公司
 SHIJIAZHUANG PHARMA WEISHENG
 PHARMACEUTICAL (SHIJIAZHUANG) CO., LTD.
 总经理
 GENERAL MANAGER