



UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI METODE ANALISIS DAN PENENTUAN KADAR
VITAMIN C PADA MINUMAN BUAH KEMASAN DENGAN
SPEKTROFOTOMETRI UV-VISIBLE**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

LARAS ANDRIA WARDANI

0806399722

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI KIMIA

DEPOK

JANUARI 2012

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan
benar.

Nama : Laras Andria Wardani

NPM : 0806399722

Tanda Tangan : 

Tanggal : 6 Januari 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Laras Andria Wardani
NPM : 0806399722
Program Studi : Kimia
Judul Skripsi : Validasi Metode Analisis dan Penentuan Kadar Vitamin C
Pada Minuman Buah Kemasan Dengan Spektrofotometri
UV-Visibel.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Drs Sunardi, M.si

Penguji : Prof. Endang Asijati, M.Sc

Penguji : Dr. Herry Cahyana

Penguji : Dr. Yoki Yulizar



(
(
(
(

Ditetapkan di : Departemen Kimia Universitas Indonesia

Tanggal : 6 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Puji Syukur Penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena atas rahmat dan karunia-Nya Penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini tepat pada waktunya. Salawat serta salam semoga senantiasa terlimpahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW yang merupakan suri tauladan bagi kita semua.

Dalam penulisan skripsi ini Penulis tidak lepas dari bantuan berbagai pihak yang telah membantu dan mendukung Penulis dalam melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi ini. Terima kasih Penulis sampaikan kepada papah mamah tersayang dan kakak yang selama ini selalu mendukung dan memberi semangat Penulis hingga penelitian dan penulisan skripsi ini dapat berjalan dengan baik dan lancar.

Ucapan terima kasih yang secara khusus juga Penulis sampaikan kepada :

1. Kepada Drs. Sunardi, M.si. selaku pembimbing I atas bantuannya selama penelitian dan penyusunan skripsi yang sangat berarti bagi Penulis.
2. Kepada Dra. Siswati Setiasih, M.Si. selaku pembimbing akademis atas segala bantuannya sehingga memperlancar proses penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Kepada Dr. Ridla Bakri selaku ketua Departemen Kimia FMIPA UI.
4. Kepada Dra. Tresye Utari, M.Si. selaku koordinator penelitian yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dalam penelitian.
5. Kepada seluruh dosen-dosen kimia UI yang selama ini telah mengajarkan ilmu-ilmu yang sangat bermanfaat bagi penulis.
6. Kepada Pak Hedi S, Pak Marji, Pak Hadi, Pak Sutrisno (Babeh), Mbak Ema, Mba Sri, Mbak Ina, Mbak Cucu, Pak Min, Pak Kiri serta seluruh staf departemen Kimia yang telah banyak membantu terlaksananya penelitian.
7. Kepada kedua orang tua yang telah memberikan kasih sayangnya serta dukungan moril dan materi kepada saya.
8. Ka Puji, Ka Rasyid, Ka Alfin, Ka rispa, Ka Zora, Ka Dyo, Ka Daniel sebagai penanggung jawab lab afiliasi yang telah membantu saya dalam penelitian.

9. Kepada sahabat-sahabatku: Micu, Fairuz, Indri, Puti, Cipa, Risa, Bocil, Lilid, Aisha, Dinda, Sesin, Vivi, Lintang, Dea, Uni, dila, Maris, Septri, Pipit, Bos, Yogi, Andi, James, Lia, Mimit, Vina, Via, Frida, Ebsya, Hapiz, Boy, Ovan, Asa, Dimas, Haris, Mamat, Deska, Juangga dan semua teman-teman keluarga besar Nonreg 2008 yang sudah penulis anggap sebagai keluarga. Terima kasih atas masa-masa indah yang telah diberikan.
10. Kepada Vivi, Dinda, yogi, Bu Nurlita, Ka Sonia, Ka Rohman, atas bantuan dan diskusinya selama penelitian.
11. Kepada rekan-rekan seperjuangan penelitian : Kakak-kakak angkatan 05, 06, 07 dan teman-teman angkatan 08.
12. Kepada teman-teman Jurusan Kimia FMIPA UI khususnya angkatan 2008 baik paralel maupun reguler serta berbagai pihak yang telah membantu namun belum tercantumkan dalam laporan ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan masih jauh dari kata sempurna, sehingga skripsi ini pun kiranya masih perlu evaluasi untuk penyempurnaan. Oleh karena itu, penulis sangat terbuka terhadap kritik dan saran yang membangun dari semua pihak. Penulis juga berharap penelitian dan skripsi ini dapat bermanfaat bagi seluruh pihak yang membaca terlebih bagi pembaca yang akan melaksanakan dan membuat penelitian terkait judul dan tema berikut.

Jakarta, Desember 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Laras Andria Wardani
NPM : 0806399722
Program Studi : Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Validasi Metode Analisis dan Penentuan Kadar Vitamin C Pada Minuman Buah Kemasan Dengan Spektrofotometri UV-Visibel.

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 6 Januari 2012

Yang menyatakan



(Laras Andria Wardani)

ABSTRAKSI

Nama : Laras Andria Wardani
Program Studi : Kimia
Judul : Validasi Metode Analisis dan Penentuan Kadar Vitamin C Pada Minuman Buah Kemasan Dengan Spektrofotometri UV-Visibel.

Asam askorbat adalah senyawa kimia yang disebut juga vitamin C dengan rumus molekul $C_6H_8O_6$ larut dalam air dan memiliki sifat antioksidan. Karena sifatnya yang menguntungkan bagi kesehatan, maka kebutuhan manusia akan vitamin C semakin meningkat. Semakin berkembangnya produk-produk makanan, minuman, obat-obatan dsb, yang mengandung vitamin C maka diperlukan pengawasan terhadap kadar vitamin C dalam produk tersebut. Dalam penelitian ini dilakukannya validasi metode analisis vitamin C dengan spektrofotometri UV-Visibel yang selanjutnya digunakan untuk analisis vitamin C pada minuman buah kemasan. Parameter metode validasi dalam penelitian ini meliputi uji presisi, uji linearitas, uji selektifitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, uji sampel, dan uji akurasi. Berdasarkan hasil penelitian didapat panjang gelombang yang terpilih untuk asam askorbat adalah 243 nm untuk 30 s/d 100 ppm dan 265 nm untuk 30 s/d 0 ppm. Hasil analisis data untuk linieritas, didapatkan koefisien relasi (r) pada 265 nm yaitu 0,997 dan pada 243nm yaitu 0,998. Dengan Limit deteksi adalah 0,607 ppm dan limit kuantitasi adalah 2,024 ppm. Akurasi dari metode ini ditentukan berdasarkan hasil perolehan kembali menggunakan metode spike standar, sedangkan presisi diukur dengan menghitung simpangan baku relative. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa metode analisis dalam penetapan kadar asam askorbat dengan spektrofotometri UV-Visible merupakan metode yang baik digunakan, relative murah dan mudah yang dapat menghasilkan ketelitian dan ketepatan yang tinggi.

Kata kunci : asam askorbat, validasi metode analisis, spektrofotometri UV-Visibel, uji presisi, akurasi, linieritas, batas deteksi, batas kuantisasi, uji sampel.

ABSTRACT

Name : Laras Andria Wardani
Study Program : Kimia
Title : Analysis Method Validation and Determination of levels of Vitamin C in Fruit Beverage Packaging With UV-Visible Spechtrophotometry

Ascorbic acid is a chemical compound also known as vitamin C with molecular formula $C_6H_8O_6$ dissolve in water and has antioxidant properties. Because it is beneficial to health, the human need for vitamin C increases. The continued development of food products, beverages, medicines, etc., which contain vitamin C it is necessary to supervise the levels of vitamin C in the product. In this study does validate methods of analysis of vitamin C with UV-visible spectrophotometry was then used for analysis of vitamin C in fruit drinks packaging. Parameter validation methods in the study include a test of precision, linearity test, test of selectivity, detection limit, quantification limit, the test sample, and test accuracy. Based on research results obtained for the selected wavelength ascorbic acid was 243 nm for 30 s/d 100 ppm and 265 nm for 30 s/d 0.607 ppm. The results of analysis for linearity, obtained relation coefficient (r) at 265 nm is 0.997 and 243nm is 0.998. With the detection limit is 0.607 ppm and the limit of quantization was 2.024 ppm. The accuracy of this method is determined based on the results of spike recoveries using standard methods, while the precision is measured by calculating the relative standard deviation of repeated measurements by ten times. From the results of the study concluded that the method of analysis in the determination of ascorbic acid levels by UV-Visible spectrophotometry is an excellent method to use, relatively inexpensive and easy to produce high precision and accuracy.

Key words: ascorbic acid, validation of analytical methods, UV-visible spectrophotometry, test precision, accuracy, linearity, limit of detection, limit of quantization, sample test.

DAFTAR ISI

| | |
|--|-------------|
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS..... | i |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | ii |
| KATA PENGHANTAR..... | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI..... | v |
| ABSTRAK..... | vi |
| DAFTAR ISI..... | viii |
| DAFTAR GAMBAR..... | xi |
| DAFTAR TABEL..... | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xii |
| | |
| BAB I PENDAHULUAN | |
| I.1 Latar Belakang Masalah..... | 1 |
| I.2 Perumusan Masalah..... | 2 |
| I.3 Tujuan Penelitian..... | 3 |
| I.4 Hipotesis..... | 3 |
| I.5 Manfaat Penelitian..... | 3 |
| | |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | |
| II.1 Vitamin C..... | 4 |
| II.1.1 Sifat Fisika dan Kimia..... | 4 |
| II.1.2 Fungsi..... | 5 |
| II.1.3 Kebutuhan, Defisiensi, dan Toksisitas..... | 7 |
| II.1.4 Bahan Makanan Sumber..... | 8 |
| II.3 Validasi Metode Analisis..... | 10 |
| II.3.1 Kecermatan..... | 11 |
| II.3.2 Keseksamaan..... | 12 |

| | |
|---|----|
| II.3.3 Selektifitas..... | 14 |
| II.3.4 Linieritas dan Rentang..... | 14 |
| II.3.5 Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi..... | 15 |
| II.4 Spektroskopi..... | 16 |
| II.5 Teori Spektroskopi Serapan Sinar Ultra Violet..... | 18 |
| II.6 Instrumentasi Spektrofotometri UV-Visibel..... | 19 |
| II.7 Analisa Kualitatif dengan Metode Base-Line..... | 24 |

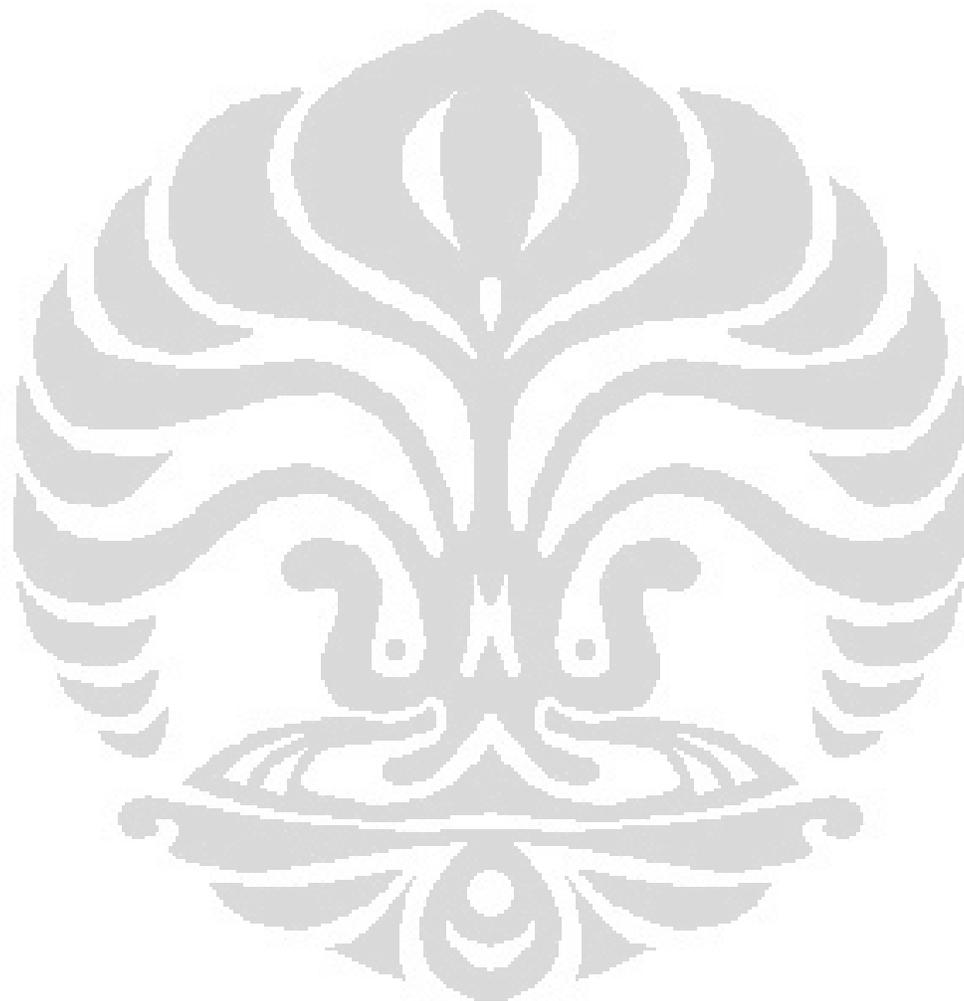
BAB III METODE PENELITIAN

| | |
|---|----|
| III.1 Metode Penelitian..... | 26 |
| III.1 Tempat dan Waktu..... | 26 |
| III.1 Alat dan Bahan..... | 26 |
| III.1.1 Alat..... | 26 |
| III.1.2 Bahan..... | 27 |
| III.2 Cara Kerja..... | 27 |
| III.2.1 Uji Stabilitas..... | 27 |
| III.2.2 Uji Presisi..... | 27 |
| III.2.3 Uji Linieritas dan Rentang..... | 28 |
| III.2.4 Uji LOD dan LOQ..... | 29 |
| III.2.5 Uji Selektifitas..... | 29 |
| III.2.6 Uji Akurasi..... | 29 |
| III.2.7 Uji Sampel..... | 29 |
| III.2.8 Kondisi Spektrofotometri..... | 30 |

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

| | |
|--|----|
| IV.1 Uji Stabilitas..... | 34 |
| IV.2 Uji Presisi..... | 35 |
| IV.3 Linieritas dan Rentang..... | 38 |
| IV.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi..... | 43 |
| IV.5 Uji Selektifitas..... | 45 |

| | |
|--|-----------|
| IV.6 Uji Sampel.. .. | 46 |
| IV.7 Uji Perolehan Kembali..... | 48 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN..... | 50 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 52 |
| LAMPIRAN..... | 56 |



DAFTAR GAMBAR

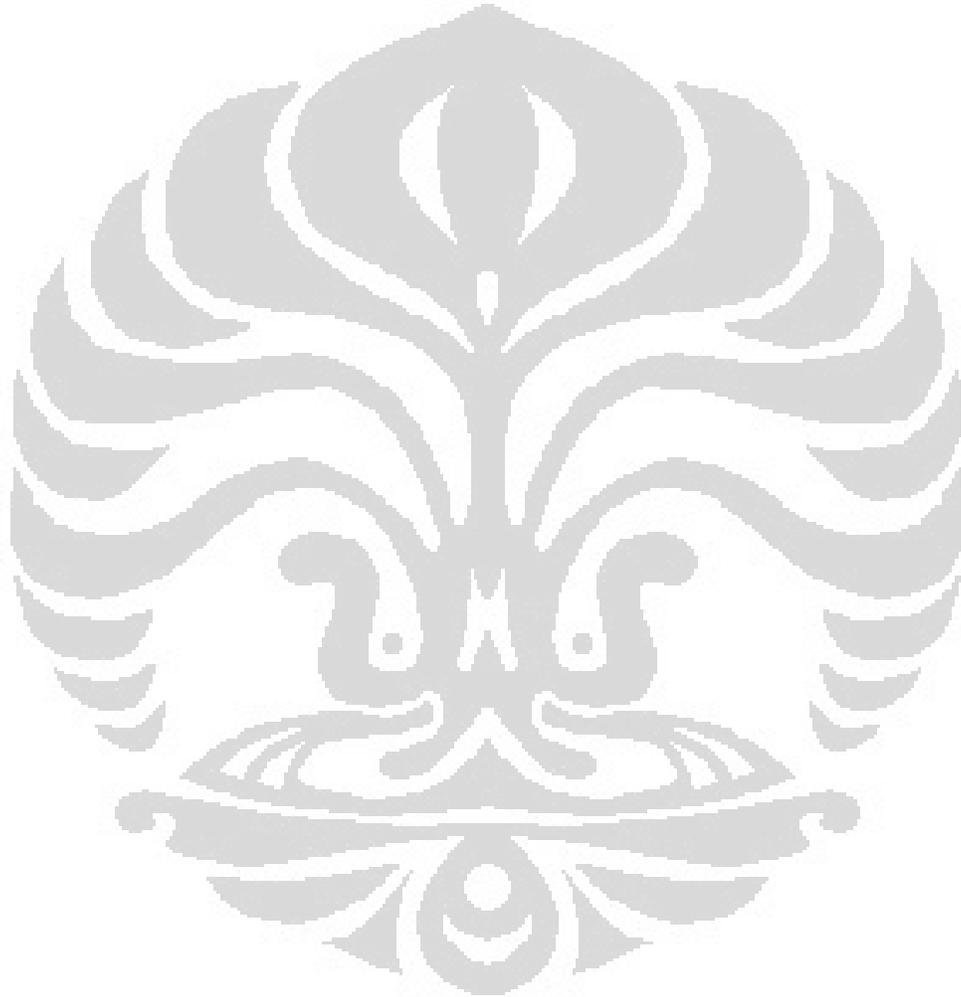
| | |
|---|----|
| Gambar 2.1 Struktur-struktur Fisiologis Vitamin C... | 4 |
| Gambar 2.2 Batas Deteksi dalam Pengujian | 16 |
| Gambar 2.3 Susunan Instrumen Spektrofotometer UV-Vis..... | 19 |
| Gambar 2.4 Sistem Optik Spektrofotometer UV-Vis Radiasi Berkas Tunggal.... | 20 |
| Gambar 2.5 Sistem Optik Spektrofotometer UV-Vis Radiasi Berkas Ganda..... | 20 |
| Gambar 2.6 Sistem Optik Spektrofotometer UV-Vis Radiasi Berkas Terpisah... | 20 |
| Gambar 2.7 Gambar Detektor Fotometer..... | 23 |
| Gambar 2.8 Analisis Kuantitatif dengan Teknik “Base-line”..... | 24 |
| Gambar 4.1 Vitamin C..... | 31 |
| Gambar 4.2 Vitamin C dengan Perbandingan Pelarut. | 32 |
| Gambar 4.3 Kurva Degradasi Vitamin C (1ppm) | 35 |
| Gambar 4.4 Metode Base-line pada Konsentrasi Vitamin C 3ppm..... | 36 |
| Gambar 4.5 Persamaan Linier Vitamin C Konsentrasi 0.1 s/d 30ppm (265nm) .. | 39 |
| Gambar 4.6 Persamaan Linier Vitamin C Konsentrasi 30 s/d 100ppm (243nm) . | 40 |
| Gambar 4.7 Persamaan Linier untuk Vitamin C (265nm) | 41 |
| Gambar 4.8 Persamaan Linier untuk Vitamin C (243nm) | 42 |
| Gambar 4.9 Grafik Uji LOD dan LOQ | 44 |
| Gambar 4.10 Grafik (a) asam sitrat 10ppm (b) vitamin C 10ppm (c) Percampuran Antara Vitamin C dengan Asam Sitrat..... | 46 |
| Gambar 4.11 Grafik Sampel A dan B yang Diencerkan Sepuluh Kali..... | 47 |
| Gambar 4.12 Grafik (a) Sampel A yang Diencerkan Sepuluh Kali (b) Sampel A yang Ditambahkan Standar Vitamin C 10ppm | 48 |
| Gambar 4.15 Grafik (a) Sampel B yang Diencerkan Sepuluh Kali (b) Sampel B yang Ditambahkan Standar Vitamin C 10ppm | 49 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 2.1 Kandungan Vitamin C dalam Bahan Makanan Sumber | 9 |
| Tabel 2.2 Nilai Persen Recovery | 11 |
| Tabel 4.1 Uji Presisi untuk Analisis Instrumen | 37 |
| Tabel 4.2 Uji Presisi untuk Analisis Individu | 37 |
| Tabel 4.3 Uji Presisi untuk Kurva Standar Linearitas | 38 |
| Tabel 4.4 Konsentrasi Standar Vitamin C (265nm) | 39 |
| Tabel 4.5 Konsentrasi Standar Vitamin C (243nm) | 40 |
| Tabel 4.6 Konsentrasi Linier Standar Vitamin C (265nm) | 41 |
| Tabel 4.7 Konsentrasi Linier Standar Vitamin C (243nm) | 42 |
| Tabel 4.8 Standar Deviasi untuk Persamaan Linier Vitamin C (265 nm) | 43 |
| Tabel 4.9 Standar Deviasi untuk Persamaan Linier Vitamin C (243 nm) | 43 |
| Tabel 4.10 LOD dan LOQ untuk Persamaan Linier Vitamin C | 44 |
| Tabel 4.11 Kadar Vitamin C dalam Sampel Minuman Buah Kemasan | 44 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| Lampiran 1 Persamaan Liniear untuk Vitamin C | 56 |
| Lampiran 2 Uji Liniearitas Vitamin C | 62 |
| Lampiran 3 Bagan Kerja | 63 |
| Lampiran 4 Uji sampel..... | 64 |



BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang Masalah

Vitamin C (Taylor,1993) adalah salah satu zat gizi yang berperan sebagai antioksidan efektif atau mengatasi radikal bebas yang dapat merusak sel atau jaringan, termasuk melindungi lensa dari kerusakan oksidatif yang ditimbulkan oleh radiasi.

Status vitamin C seseorang sangat tergantung dari usia, jenis kelamin, asupan vitamin C harian, kemampuan absorpsi dan ekskresi, serta adanya penyakit tertentu (Schetman dkk,1989; Levine dkk, 1955). Rendahnya asupan serat dapat mempengaruhi asupan vitamin C karena bahan makanan sumber serat seperti sayuran dan buah-buahan juga merupakan sumber vitamin C (Narins, 1996). Sampai saat ini angka prevalensi penderita defisiensi vitamin C di Indonesia belum ada. Survey nasional tahun 1988-1994 yang dilakukan di Amerika Serikat mendapatkan 10-13% penduduk menderita defisiensi Vitamin C (Heseker dan Schneider 1994).

Matilainen dkk, (1996) melakukan penelitian dengan membandingkan kadar vitamin C plasma di dua tempat berbeda. Hasilnya terdapat perbedaan kadar vitamin C pada kedua tempat tersebut. Perbedaan tersebut dihubungkan dengan perbedaan konsumsi sayur dan buah, dimana kadar vitamin C plasma lebih tinggi bila mengonsumsi buah dan sayur segar setiap hari, dibandingkan dengan subjek yang lebih banyak mengonsumsi dalam bentuk yang sudah diolah.

Salah satu produk pangan yang sudah diolah dalam bentuk kemasan, yang saat ini sedang mencuat dipasaran adalah minuman ringan jenis buah kemasan. Minuman buah kemasan ini sangat mudah dijumpai di pusat-pusat perbelanjaan (supermarket/pasar swalayan). Manusia mutlak memerlukan vitamin C dari luar tubuh untuk memenuhi kebutuhannya (Carr dan Frei,

1999). Pada kenyataannya, masyarakat lebih memilih minuman buah kemasan dibandingkan dengan mengkonsumsi vitamin C pada buah alami, hal ini dikarenakan minuman buah kemasan yang mudah ditemukan dimanapun dan penggunaannya yang relative lebih praktis. Tetapi kandungan vitamin C dalam label kemasan minuman buah tersebut diduga tidak sesuai dengan apa yang tertera pada kemasan. Oleh karena itu, diperlukannya pengawasan yang merupakan salah satu bentuk upaya untuk melindungi konsumen dari informasi label yang tidak benar.

Pada penelitian kali ini akan dilakukan validasi metode analisis dan memeriksa apakah kadar vitamin C pada minuman buah kemasan sesuai dengan kadar yang tercantum pada label minuman buah kemasan tersebut dan diharapkan penelitian ini juga dapat membantu dalam pengawasan kadar vitamin C pada minuman buah kemasan yang beredar di pasaran.

I.2 Perumusan Masalah

Kebutuhan manusia akan vitamin C semakin meningkat diiringi semakin berkembangnya produk-produk baik makanan, minuman, obat-obatan dan lain sebagainya. Oleh karena itu kebutuhan tersebut harus ditunjang dengan dengan kesediaan vitamin C yang tinggi. Namun dilain pihak produsen harus memperhatikan kandungan dan kadar vitamin C dari proses pembuatannya. Adanya produsen yang tidak memperhatikan kandungan dan kadar vitamin C akan menyebabkan dampak negative bagi tubuh. Karena manusia mutlak memerlukan vitamin C dari luar tubuh untuk memenuhi kebutuhannya (Carr dan Frei, 1999). Oleh karena itu penelitian ini dimaksudkan untuk menguji kadar dan kandungan dari vitamin C pada sampel minuman buah kemasan yang terdapat dipasaran.

Validasi metode analisis dengan spektrofotometri UV-Visible dilakukan untuk mengidentifikasi vitamin C dalam sampel minuman buah kemasan. Dengan metode ini diharapkan peneliti dapat menentukan kadar dan

kandungan vitamin C yang terdapat dipasaran dengan baik. Cara kerja dari penelitian ini yaitu dengan membuat larutan standard vitamin C dengan berbagai macam konsentrasi dan diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV-Visibel kemudian mencari panjang gelombang maksimum, membuat kurva kalibrasi dari vitamin C, menentukan batas deteksi dan kuantisasi, uji selektifitas dari pencampuran vitamin C dengan asam sitrat, uji presisi terhadap vitamin C, kemudian menentukan kadar vitamin C dalam sampel minuman buah kemasan yang diperoleh dipasaran.

I.3 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh prosedur penentuan kadar vitamin C dengan validasi metode analisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis.
2. Menentukan kadar vitamin C pada minuman buah kemasan yang beredar dipasaran

I.4 Hipotesis

Validasi metode analisis dengan spektrofotometri UV-Visible mampu mengidentifikasi vitamin C dengan akurat dan teliti didalam sampel minuman buah kemasan.

I.5 Manfaat Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian ini, didalam bidang penelitian diharapkan metode ini mampu mengidentifikasi vitamin C dengan baik dan akurat dan menghasilkan suatu data-data yang secara statistik dapat dipertanggung-jawabkan dengan batasan-batasan nilai yang sesuai dengan acuan standar yang berlaku.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 VITAMIN C

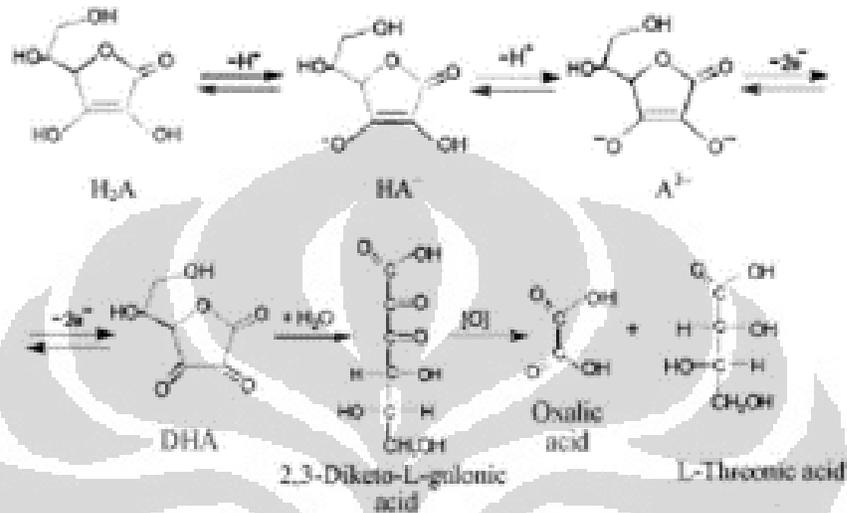
Vitamin C merupakan vitamin yang termasuk dalam kelompok vitamin larut dalam air dan dikenal sebagai vitamin anti askorbut karena berkhasiat menyembuhkan penyakit skorbut. Pada tahun 1928, Zents Gyorgyi berhasil mengisolasi faktor anti askorbut yang kemudian dinamakan asam hexuronik. Isolasi didapat jaringan adrenal, jeruk dan kubis. Pada tahun 1932, ia bersama C.glenn king menyatakan bahwa asam hexuronik adalah vitamin C (Narins, 1996).

II.1.1 Sifat Fisika dan Kimia

Vitamin C merupakan vitamin yang dapat dibentuk oleh beberapa jenis spesies tanaman dan hewan dari prekursor karbohidrat. Sayang sekali manusia tidak dapat mensintesis vitamin C dalam tubuhnya, karena tidak memiliki enzim L-gulonolakton oksidase. Manusia mutlak memerlukan vitamin C dari luar tubuh untuk memenuhi kebutuhannya (Carr dan Frei, 1999).

Struktur vitamin C mirip dengan struktur monosakarida, tetapi mengandung gugus enediol. Pada vitamin C terdapat gugus enediol yang berfungsi dalam sistem perpindahan hydrogen yang menunjukkan peranan penting dari vitamin ini. Vitamin C mudah dioksidasi menjadi bentuk dehidro, keduanya secara fisiologis aktif dan ditemukan di dalam tubuh. Vitamin C dapat dioksidasi menjadi asam L-dehidroaskorbat terutama jika terpapar cahaya, pemanasan dan suasana alkalis. Selanjutnya jika asam L-dehidroaskorbat dioksidasi lebih lanjut akan terbentuk asam

2,3 diketogulonik, lalu dapat menjadi asam oksalat dan 1-asam treonik. Reaksi vitamin C menjadi asam L-dehidroaskorbat bersifat reversible, sedangkan reaksi reaksi yang lainnya tidak. (Thurnham dkk, 2000).



Gambar 2.1 Struktur-struktur fisiologis vitamin C

Vitamin C termasuk golongan vitamin yang sangat mudah larut dalam air, sedikit larut dalam alcohol dan gliserol, tetapi tidak dapat larut dalam pelarut non polar seperti eter, benzene, kloroform dan lain-lain. Berbentuk Kristal putih, tidak berbau, bersifat asam dan stabil dalam bentuk kering. Karena mudah dioksidasi, maka vitamin C merupakan suatu reduktor yang kuat (Thurnham dkk, 2000).

II.1.2 Fungsi

Vitamin C adalah zat pereduksi kuat yang dapat bertindak sebagai antioksidan. Vitamin C merupakan antioksidan efektif sebagai scavenger terhadap radikal superoksida, peroksil, dan hidroksil. Disamping itu juga kofaktor atau koenzim dalam reaksi hidroksilasi. Vitamin C dianggap berperan pula untuk memulihkan radikal tokoferol quinon menjadi tokoferol

tereduksi yang mempunyai efek sebagai pencegat (interceptor) radikal bebas membrane, sehingga fungsinya kembali membaik. Re-reduksi radikal askorbat terjadi secara spontan (dengan jalan bereaksi sesamanya) atau oleh bantuan glutathion atau NADH sebagai kofaktor pereduksi (Carr dan Frei, 1999).

Beberapa fungsi vitamin C yang sangat penting adalah sintesis kolagen, biosintesis karnitin, metabolisme histamine, sintesis neurotransmitter (norepinefrin) dan fungsi imun, serta meningkatkan kemampuan absorpsi zat besi nonheme, hidrosilasi kolestrol di mikroso hepatic agar dapat diekskresikan dalam asam empedu, mereduksi metal yang toksik dan meningkatkan imunitas (Levine dkk, 1995; combs 1992).

Sebagai antioksidan vitamin C yang efektif dalam mereduksi superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH°) dan hydrogen peroksida H_2O_2 . Sebagai donor electron, vitamin C sangat ideal karena intermediate radikal bebasnya paling tidak toksik dibanding radikal bebas lainnya (Machlin dan Bendich, 1987). Salah satu peran yang tidak menguntungkan dari vitamin C ialah bila terdapat ion logam seperti transisi seperti besi dan tembaga, vitamin C dapat berperan sebagai oksidan bila bereaksi dengan logam transisi sehingga dapat memicu terjadinya peroksidasi lipid (Combs, 1992). Akan tetapi karena jumlah yang sedikit dari ion ion logam itu, maka secara in vivo sifat antioksidan dari vitamin C lebih dominan (Chombs, 1992; Carr dan Frei, 1999).

Fungsi lain dari vitamin C yang menguntungkan adalah mampu dengan cepat mereduksi kembali radikal α tokoperoksil dan bekerja secara sinergis menghadapi stress oksidatif pada membrane atau lipoprotein dan cairan. Reaksi reduksi-oksidasi asam askorbat-asam dehidroaskorbat yang berkaitan dengan aktivitas GSH (glutathion tereduksi) dapat lebih mengefektifkan metabolisme glukosa melalui jalur HMP (hexosa mono phospat), (Niki dkk, 1995). GSH juga menyebabkan vitamin C dan α

tokoferol dalam status tereduksi. Penurunan GSH jaringan akan menimbulkan kerusakan sel, gangguan imunitas dan proses penuaan.

Selain itu, manfaat lain dari vitamin C ialah turut berperan dalam pencegahan timbulnya katarak, vitamin C merupakan antioksidan poten untuk mengatasi radikal bebas yang dapat merusak sel atau jaringan, termasuk melindungi lensa dari kerusakan oksidatif yang ditimbulkan oleh radiasi UV (Taylor, 1933)

II.1.3 Kebutuhan, Defisiensi dan Toksisitas

Kebutuhan vitamin C yang dianjurkan (AKG) bagi laki-laki dan perempuan berusia lebih dari 13 tahun sebesar 60 mg/hari (Muhilal dkk, 1998). Keadaan stress metabolic seperti tindakan operatif, trauma, kanker, dan luka bakar meningkatkan kebutuhan vitamin C. penggunaan pil anti hamil dan kebiasaan merokok menurunkan kadar vitamin C plasma (Schetman dkk, 1989). Sedangkan menurut Carr dan Frei (1999) dosis 60 mg/hari tersebut dibuat berdasarkan kebutuhan rata rata untuk mencegah penyakit skorbut. Namun beberapa bukti ilmiah perlunya meningkatkan asupan vitamin C karena dihubungkan dengan upaya untuk menurunkan penyakit kronis seperti penyakit kardiovaskuler, kanker, dan katarak. Ausman (1999) menganjurkan vitamin C diberikan 100-200 mg/hari dan tidak melebihi 1000 mg/hari, hal ini dianggap cukup untuk melindungi tubuh dari penyakit dan pemberian dosis melebihi 1000 mg/hari dapat memberikan efek samping.

Defisiensi vitamin C dapat menimbulkan beberapa gejala, dari yang ringan sampai berat. Defisiensi ringan ditandai dengan timbulnya kelelahan, anoreksia, nyeri otot dan lebih mudah stress dan infeksi, sedangkan defisiensi berat menimbulkan penyakit skorbut. Bila pengobatan yang yang diberikan terlambat dapat menyebabkan kematian (thurnmham dkk, 2000).

Vitamin C sebenarnya merupakan vitamin yang relatif tidak toksik, tetapi pernah dilaporkan asupan 1 gram/hari dapat menimbulkan mual dan diare, tes glukosa darah kurang akurat dan terbentuknya batu ginjal (Ausman, 1999). Konsumsi vitamin C berlebihan dapat menyebabkan rebound scurvy, sehingga individu yang telah terbiasa mengkonsumsi dalam jumlah yang banyak, bila hendak menghentikan kebiasaan tersebut harus dilakukan secara bertahap (Ausman, 1999).

II.1.4 Bahan makanan sumber

Vitamin C dapat ditemukan pada bahan makanan nabati maupun hewani. Sumber utama vitamin ini adalah buah buahan dan sayur sayuran seperti melon, jeruk, tomat, strawberi, asparagus, brokoli, kubis, dan kembang kol. Sedangkan bahan makanan yang berasal dari hewan seperti daging dan susu kandungan vitamin C nya lebih sedikit (Ausman, 1999).

Vitamin C sangat mudah rusak selama proses persiapan atau penyajian, pemasakan dan penyimpanan. Sayur sayuran segar yang telah dibersihkan atau disiangi, kemudian disimpan atau didiamkan selama 24 jam, maka sebanyak 45% kandungan vitamin C nya akan berkurang. Cara memasak bahan makanan sumber vitamin C adalah dengan menggunakan sesedikit mungkin air dan air tersebut sebaiknya turut dikonsumsi juga. Oleh karena itu sumber vitamin C dari makanan yang paling baik adalah memakan langsung buah buahan dalam keadaan ranum dan segar (Ausman, 1999).

Perlu juga diwaspadai kandungan Fe dan Cu yang tinggi pada bahan makanan seperti hati karena vitamin C dapat berperan sebagai oksidan bila bereaksi dengan logam transisi tersebut sehingga dapat memicu terjadinya peroksidasi lipid (Combs, 1992).

Tabel 2.1 Kandungan vitaminC dalam bahan makanan sumber

| Bahan makanan | Vitamin C mg/100 g |
|----------------------|---------------------------|
| Buah buahan | |
| Jambu biji | 300 |
| Strawberi | 40-90 |
| Jeruk | 50 |
| Anggur | 40 |
| Melon | 13-33 |
| Apel | 10-30 |
| Rasberi | 18-25 |
| Peach | 7-14 |
| Pisang | 10 |
| Ceri | 10 |
| Jambu | 116 |
| Duwet | 85.3 |
| Sukun | 58.4 |
| Produk hewani | |
| Hati, ginjal | 10-40 |
| Susu sapi | 1-2 |
| Daging | 0-2 |
| Sayur mayur | |
| Lada | 125-200 |
| Aterseli | 170 |
| Brokoli | 90-150 |
| Bayam | 50-90 |
| Kembang kol | 60-80 |
| Kol | 30-60 |
| Daun bawang | 15-30 |

| | |
|---------------|------------|
| Kacang | 10-30 |
| Bawang | 10-30 |
| Kentang | 10-30 |
| Kapri | 10-30 |
| Jagung | 12 |
| Wortel | 5-10 |
| Daun katuk | 164 |
| Daun singkong | 125-1 |
| Paria putih | 58 |
| Selada air | 56 |
| Toge | 46 |
| Tomat | 34 |
| ASI | 5-6 |

Sumber : Combs dkk,1992; Depkes 1995

II.3 VALIDASI METODE ANALISIS

Validasi metode analitis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium ,untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Tetrasari, 2003).

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode dibawah ini:

II.3.1 Kecermatan

Kecermatan adalah kedekatan hasil uji antara hasil yang diperoleh dengan nilai sebenarnya (true value) atau dengan nilai referensinya (Chown Chung Chan et all, 2004). Kecermatan menggambarkan kesalahan sistematis dari suatu hasil pengukuran. Kesalahan sistematis berasal dari pengaruh-pengaruh yang dapat diketahui dengan pasti dan bersifat konstan. Sumber kesalahan bisa dari kelembaban, bahan referensi, ketidakpastian yang diberikan oleh sertifikat, metode analisis dan lain-lain (Sumardi, 2005). Kesalahan sistematis memberikan penyimpangan positif dan penyimpangan negative dalam percobaan.

Kecermatan dinyatakan sebagai persen kembali analit yang ditambahkan dan nilai kecermatan dapat dinyatakan dengan persen perolehan kembali (persen recovery). Ketika penentuan batasan uji perolehan kembali belum ditentukan oleh laboratorium yang melakukan pengujian maka sebagai batasan awal dapat ditentukan berdasarkan table dibawah ini:

Tabel 2.2 Nilai persen recovery

| Analit pada matrik sampel (%) | Recovery yang diterima (%) |
|-------------------------------|----------------------------|
| 100 | 98-102 |
| >10 | 98-102 |
| >1 | 97-103 |
| >0.1 | 95-105 |
| 0.01 | 90-107 |
| 0.001 | 90-107 |
| 0.0001 (1ppm) | 80-110 |
| 0.00001 (100ppb) | 80-110 |
| 0.000001 (10ppb) | 60-115 |
| 0.0000001 (1ppb) | 40-120 |

Sumber: Wood, 1998

Terdapat dua cara dalam menentukan kecermatan suatu metode:

a. Metode simulasi (standar sebagai sampel)

Dalam metode simulasi sejumlah analit bahan murni diukur kadarnya terlebih dahulu (dengan konsentrasi yang sudah diketahui), kemudian ditambahkan kedalam bahan campuran pembawa sediaan (placebo adalah campuran pereaksi yang digunakan) lalu campuran diukur dan dianalisis, dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar sebenarnya).

b. Metode penambahan bahan baku (standar adisi)

Pada metode penambahan baku, sejumlah analit bahan murni yang diketahui kadarnya ditambahkan pada sampel yang telah mengandung analit, namun tidak diketahui kuantitasnya. Matriks sampel yang telah mengandung analit juga dianalisis. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya.

II.3.2 Keseksamaan

Keseksamaan adalah kedekatan hasil uji dengan cara memperoleh pengukuran dari berbagai contoh yang homogen dalam kondisi yang normal (Chown Chung Chan et all, 2004). Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Pengujian keseksamaan umumnya mencakup pemeriksaan replitabilitas, keseksamaan antara, dan reproduibilitas (keterulangan). Dalam percobaan ini dilakukan dengan melakukan uji replitabilitas yakni dilakukan oleh seorang analisis, menggunakan laboratorium yang sama. Uji replitabilitas dilakukan untuk mengetahui variabilitas data yang dihasilkan dalam beberapa

pengujian berurutan pada kondisi yang sama. Repeatabilitas ini untuk melihat konsistensi analisis, tingkat kesulitan metode dan contoh uji.

Pada umumnya nilai keseksamaan dihitung menggunakan standar deviasi (SD) untuk menghasilkan *Relative Standard Deviation* (RSD) atau *Coefficient Variation* (CV). Keseksamaan yang baik dinyatakan dengan semakin kecil persen RSD maka nilai presisi semakin tinggi. Kriteria seksama juga diberikan jika metode memberikan simpangan baku relative atau koefisien variasi 2% atau kurang dan $RSD \leq 15\%$. Makin kecil nilai standar deviasi yang diperoleh, maka makin kecil pula nilai koefisien variasinya. Nilai standar deviasi dan persen koefisien variasi dapat dihitung dengan mengikuti persamaan ekuivalen:

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

$$\%RSD = \frac{sd}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Keterangan:

x_i = pengukuran tunggal

\bar{x} = rata rata

n = jumlah pengukuran

menurut Sumardi, 2005 keseksamaan dinyatakan dengan *presentase Relative Standard Deviation* (%RSD) dengan batas batas yang masih dapat diterima berdasarkan ketelitiannya. Tingkat ketelitiannya terdiri dari :

$RSD \leq 1\%$ = sangat teliti

$1\% < RSD \leq 2\%$ = teliti

$2\% < RSD < 5\%$ = ketelitian sedang

$RSD > 5\%$ = ketelitian rendah

II.3.3 Selektivitas

Selektivitas atau spesifitas 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 sering kali dapat dinyatakan dengan derajat penyimpangan metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa campuran senyawa yang dianalisis dan membandingkannya.

II.3.4 Linieritas dan Rentang

Linieritas adalah kemampuan (dalam rentang) metode analisis memberikan respon secara langsung atau bantuan transformasi matematik yang baik, untuk mendapatkan hasil dari variable data (absorbansi dan rentang kurva) dimana secara langsung proposional dengan konsentrasi (sesuai analit) dalam contoh kisaran yang ada, serta untuk mengetahui kemampuan standar dalam mendeteksi analit dalam contoh (Chown Chung Chan et all, 2004). Artinya linieritas suatu metode digunakan untuk mengetahui kemampuan standar, sehingga dapat membuktikan adanya hubungan linier antara konsentrasi analit dengan respon detektor.

Uji linearitas ini dilakukan dengan suatu larutan baku yang terdiri atas minimal 5 konsentrasi yang naik dengan rentang 50-100% dari rentang komponen uji. Kemudian data diproses dengan menggunakan regresi linear, sehingga dapat diperoleh respon linier terhadap konsentrasi larutan baku dengan nilai koefisien korelasi diharapkan mendekati 1 atau diatas 0,995

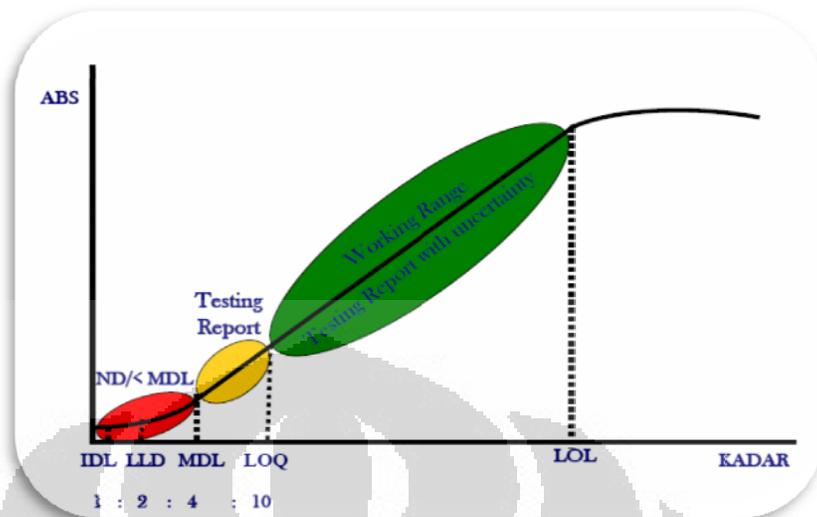
untuk suatu metode analisis yang baik. Rentang metode adalah pernyataan konsentrasi terendah dan tertinggi analit yang mana metode analisis memberikan kecermatan, keseleksamaan dan linearitas yang dapat diterima. Sebagai parameter adanya hubungan linear, digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linear $y = bx \pm a$. hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 tergantung pada arah garis. Nilai a pada regresi linier menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita, 2004).

$$r = \frac{\sum (|x_i - \bar{x}| |y_i - \bar{y}|)}{\left(\left[\sum (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum (y_i - \bar{y})^2 \right] \right)^{1/2}}$$

II.3.5 Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi

Batas deteksi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon yang significant dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas deteksi dinyatakan dalam konsentrasi analit (persen bagian permilyar) dalam sampel.

Batas kuantisasi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi criteria cermat dan seksama dan dapat dikuantifikasi dengan akurasi dan presisi yang baik. Batas kuantisasi adalah nilai parameter penentuan kuantitatif senyawa yang terdapat dalam konsentrasi rendah dalam matriks.



Gambar 2.2 Batas deteksi dalam metode pengujian

LoD (Limit of Detection) $LOD = \frac{3 \times SD}{Slope}$

LoQ (Limit of Quantitation) $LOQ = \frac{10 \times SD}{Slope}$

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

dimana, SD = Standar Deviasi (simpangan Baku) dari blanko contoh memberikan nilai deviasi standar yang tidak sama dengan nol.

II.4 Spektroskopi

Spektroskopi adalah ilmu yang mempelajari materi dan atributnya berdasarkan cahaya, suara atau partikel yang dipancarkan, diserap atau dipantulkan oleh materi tersebut. Spektroskopi juga dapat didefinisikan

sebagai ilmu yang mempelajari interaksi antara cahaya dan materi. Dalam catatan sejarah, spektroskopi mengacu kepada cabang ilmu dimana "cahaya tampak" digunakan dalam teori-teori struktur materi serta analisa kualitatif dan kuantitatif.

Metoda spektroskopi merupakan alat ukur utama pada kimia modern untuk mengidentifikasi struktur molekul. Dalam masa modern, definisi spektroskopi berkembang seiring teknik-teknik baru yang dikembangkan untuk memanfaatkan tidak hanya cahaya tampak, tetapi juga bentuk lain dari radiasi elektromagnetik dan non-elektromagnetik seperti gelombang mikro, gelombang radio, elektron, fonon, gelombang suara, sinar x dan lain sebagainya.

Spektroskopi umumnya digunakan dalam kimia fisik dan kimia analisis untuk mengidentifikasi suatu substansi melalui spektrum yang dipancarkan atau yang diserap. Pada kimia organik metoda spektroskopi digunakan untuk menentukan dan mengkonfirmasi struktur molekul, untuk memantau reaksi, dan untuk mengetahui kemurnian suatu senyawa. Alat untuk merekam spektrum disebut spektrometer.

Spektroskopi juga digunakan secara intensif dalam astronomi dan penginderaan jarak jauh. Kebanyakan teleskop-teleskop besar mempunyai spektrograf yang digunakan untuk mengukur komposisi kimia dan atribut fisik lainnya dari suatu objek astronomi atau untuk mengukur kecepatan objek astronomi berdasarkan pergeseran Doppler garis-garis spektral. Salah satu jenis spektroskopi adalah spektroskopi serapan sinar ultra violet (Mulya, 1994).

II.5 Teori Spektroskopi Serapan Sinar Ultra Violet

Umumnya sebagian besar senyawa organik dapat dianalisis secara kualitatif maupun kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 200-400 nm. Kemudian hasil pengukuran dapat diperoleh dari alat pencatat pada spektrofotometer.

Molekul-molekul dengan elektron terikat lemah dapat menyerap energi dalam daerah UV. Pengecualian, spektra UV dapat digunakan untuk menentukan ketidakjenuhan molekul-molekul yang menyerap (gugus kromofor), karena hanya molekul-molekul dengan ikatan rangkaplah yang mempunyai energi eksitasi yang cukup rendah yang menimbulkan penyerapan dalam daerah UV dekat. Sehingga hidrokarbon jenuh, alkohol, dan eter transparan tidak menunjukkan serapan dalam UV. Gugus-gugus fungsi tak jenuh seperti aldehid, keton, nitro alifatik dan ester nitrat mempunyai puncak serapan pada UV dekat, tetapi intensitasnya begitu rendah, sehingga hanya dapat digunakan pada kondisi khusus. Senyawa dengan ikatan rangkap terkonjugasi mempunyai absorptivitas molar dalam UV yang cukup tinggi.

Analisis organik dengan UV mempunyai keterbatasan, tetapi gugus olefenik, asetilenik, dan karboksil akan memberikan serapan kuat dalam daerah UV bila terkonjugasi satu dengan lainnya. Sebagian besar gugus-gugus yang tidak menyerap daerah UV dekat menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek. Penambahan gugus kromofor memperbesar sistem resonansi sehingga memperlihatkan panjang gelombang serapan bergeser ke daerah UV dekat.

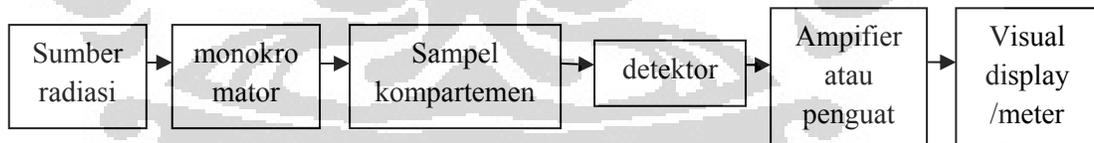
Dengan demikian, spektra UV berguna untuk mempelajari secara kualitatif sistem konjugasi. Oleh karena larutan yang digunakan biasanya encer, pemakaian hukum Beer bertujuan kuantitatif dimungkinkan.

Beberapa istilah penting pada spektra elektronik:

- Kromofor gugus tak jenuh kovalen yang menyebabkan serapan elektronik (seperti C=C, C=O dan NO₂)
- Auksokrom gugus jenuh yang bila terikat pada suatu kromofor akan mempengaruhi panjang gelombang dan intensitas serapan maksimumnya (seperti NH₂, OH, dan Cl)
- Pergeseran batokromik (pergeseran merah). Pergeseran serapan ke arah panjang gelombang lebih panjang akibat pengaruh substitusi atau pelarut.
- Pergeseran hipsokromik (pergeseran biru). Pergeseran serapan ke arah panjang gelombang lebih pendek akibat pengaruh substitusi atau pelarut.
- Efek hiperkromik. Suatu kenaikan intensitas serapan.
- Efek hipokromik. Suatu penurunan intensitas serapan. (Sunardi, 2005)

II. 6 Instrumentasi spektrofotometer UV-Vis

Pada umumnya konfigurasi dasar setiap spektrofotometer UV-Vis berupa susunan peralatan optik yang terkontruksi sebagai berikut:

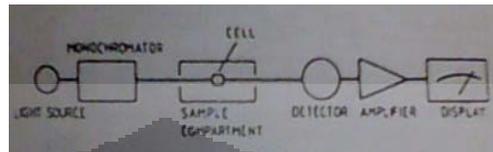


Gambar 2.3 susunan instrumen spektrofotometer UV-Vis.

Setiap bagian peralatan optik dari spektrofotometer UV-Vis memegang fungsi dan peranan tersendiri yang saling terkait fungsi dan peranannya. Setiap fungsi dan peranan tiap bagian dituntut ketelitian dan kecepatan yang optimal, sehingga akan diperoleh hasil pengukuran yang tinggi tingkat ketelitian dan ketepatannya.

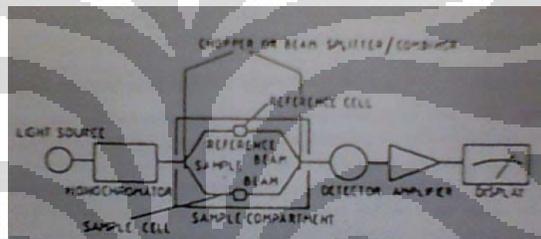
Dilihat dari sistem optik spektrofotometer dapat digolongkan menjadi tiga macam:

1. Sistem optik radiasi berkas tunggal (single beam)



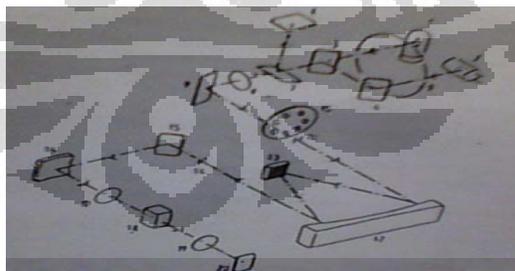
Gambar 2.4 Sistem optik spektrofotometer UV-Vis radiasi berkas tunggal (*single beam*)

2. Sistem optik radiasi berkas ganda (double beam)



Gambar 2.5 Sistem optik spektrofotometer UV-Vis radiasi berkas ganda (*double beam*)

3. Sistem optik radiasi berkas terpisah (splitter beam)



Gambar 2.6 Sistem optik radiasi berkas terpisah (splitter beam)

Spektrofotometer UV-Vis yang pertama kali diperkenalkan untuk analisis kuantitatif adalah spektrofotometer UV-Vis dengan sistem optik radiasi berkas tunggal (single beam). Kemudian dengan kemajuan teknologi

mulai dipopulerkan spektrofotometer UV-Vis radiasi berkas ganda (double beam). Salah satu kelemahan spektrofotometer radiasi berkas ganda adalah tidak mungkin kedua kuvet yang dipakai adalah betul betul identik, dan lagi intensitas radiasi yang menuju kedua kuvet juga tidak mungkin betul betul sama. Oleh sebab itu pada era terakhir ini sistem optik spektrofotometer UV-Vis cenderung kembali ke sistem optik radiasi berkas tunggal, Karena ketepatan dan ketelitian pengukurannya lebih baik dari pada sistem optik radiasi berkas ganda. Sedangkan sistem optik radiasi berkas terpisah (splitter beam) pada prinsipnya adalah sama dengan sistem optik radiasi berkas tunggal, hanya saja peralatan optiknya lebih rumit sehingga memungkinkan terjadinya penurunan intensitas radiasi setelah melalui rangkaian sistem optik yang rumit dan panjang.

1. Sumber radiasi

Beberapa sumber radiasi yang dipakai pada spektrofotometer UV-Vis adalah lampu deuterium, lampu tungsten dan lampu merkuri.

- Sumber radiasi deuterium dapat dipakai pada daerah panjang gelombang 190nm sampai 380nm (daerah ultra violet dekat). Umur sumber radiasi deuterium (D_2) sekitar 500 jam pemakaian.
- Sumber radiasi tungsten merupakan campuran dari filament tungsten dan gas iodine (halogen), oleh sebab itu disebut sumber radiasi “tungsten-iodine”. Sumber tungsten-iodine ini dipakai pada spektrofotometer UV-Vis sebagai sumber radiasi pada daerah pengukuran sinar tampak dengan rentang panjang gelombang 380-900nm. Umur tungsten-iodine sekitar 1000 jam pemakaian.
- Sumber radiasi merkuri adalah suatu sumber radiasi mengandung uap merkuri bertekanan rendah biasanya dan biasanya sumber radiasi merkuri ini dipakai untuk mengecek atau kalibrasi panjang gelombang pada spektrofotometer UV-Vis pada daerah ultra violet khususnya

disekitar panjang gelombang 365nm (365.0:365.5:dan 366.3 nm) dan sekaligus mengecek resolusi dari monokromator.

2. Monokromator

Monokromator berfungsi untuk mendapatkan radiasi monokromatis dari sumber radiasi yang memancarkan radiasi polikromatis.

Monokromator pada spektrofotometer UV-Vis biasanya terdiri dari susunan: celah (slit) masuk- filter – prisma - kisi (grating) - celah keluar.

- Celah (slitt)

Celah monokromator adalah bagian yang pertama dan terakhir dari suatu sistem optik monokromator pada spektrofotometer UV-Vis.

Celah dibuat dari logam yang kedua ujungnya diasah dengan cermat sehingga sama..

- Filter optik

Filter optik berfungsi untuk menyerap warna komplementer sehingga cahaya tampak yang diteruskan merupakan cahaya yang berwarna sesuai dengan warna filter optik yang dipakai. Filter optik yang sederhana dan banyak dipakai terdiri dari kaca yang berwarna. Dengan adanya filter optik sebagai bagian dari monokromator akan dihasilkan pita cahaya sangat sempit sehingga kepekaan analisisnya lebih tinggi.

- Prisma dan kisi (grating)

Prisma dibuat dari leburan silica . Prisma dan kisi merupakan bagian monokromator yang terpenting. Prisma dan kisi pada prinsipnya mendispersi radiasi elektromagnetik sebesar mungkin supaya didapatkan resolusi yang baik dari radiasi polikromatis.

3. Sel atau kuvet

Kuvet atau sel merupakan wadah sampel yang akan dianalisis.

Ditinjau dari bahan yang dipakai membuat kuvet ada dua macam yaitu : kuvet dari leburan silica (kuarsa) dan kuvet dari gelas. Kuvet dari leburan silica dapat dipakai untuk analisis kualitatif dan kuantitatif pada daerah

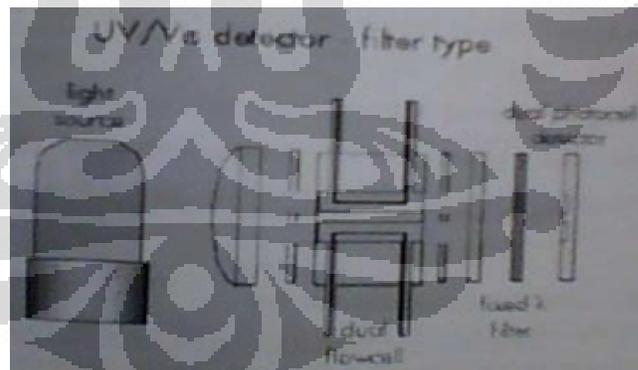
pengukuran 190-1100 nm, dan kuvet dari bahan gelas dipakai pada daerah pengukuran (380-1100nm) karena bahan dari gelas mengadsorbsi radiasi sinar UV.

4. Detektor

Detektor merupakan salah satu bagian dari spektrofotometer UV-Vis yang penting. Oleh sebab itu kualitas detektor akan menentukan kualitas spektrofotometer UV-Vis. Fungsi detektor didalam spektrofotometer adalah mengubah sinyal radiasi yang diterima menjadi sinyal elektronik.

Beberapa macam detektor yang telah dipakai dalam spektrofotometer UV-Vis adalah:

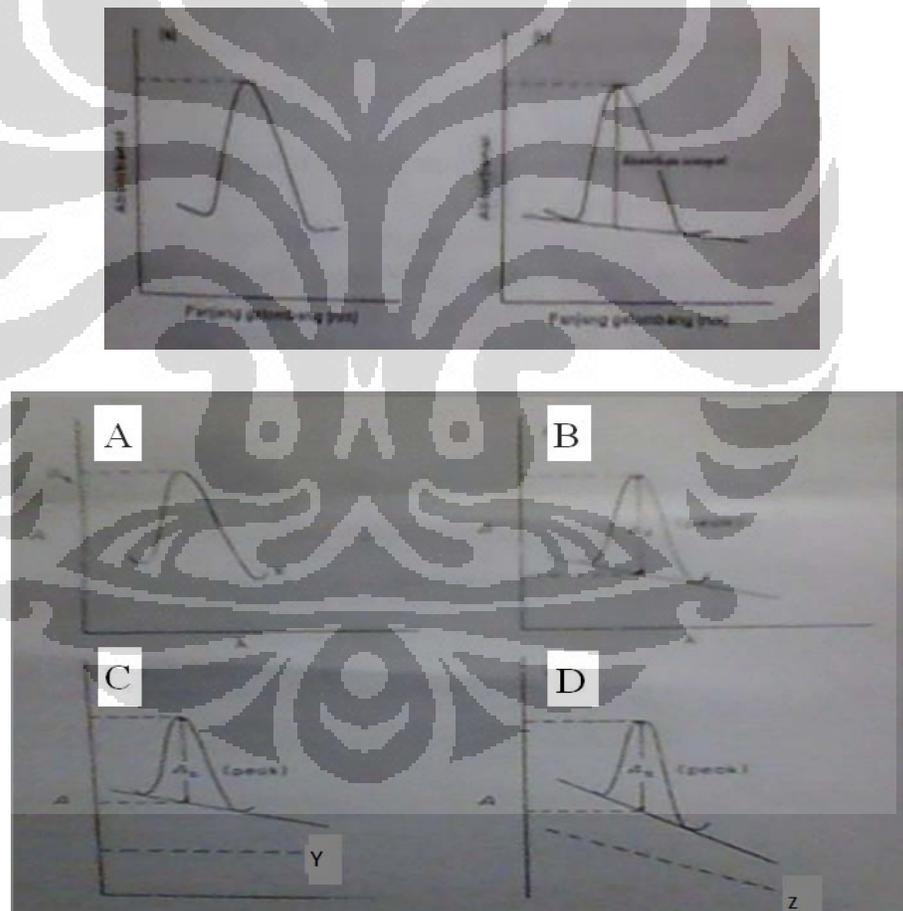
- Detektor fotosel
- Detektor tabung foton hampa
- Detektor tabung penggandaan foton (photomultiplier tube)
- Detektor photo diode-array, yang merupakan detector dengan teknologi yang modern (Mulya, 1994).



Gambar 2.7 gambar detektor fotometer

II. 7 Analisis Kualitatif dengan Metode “Base-line”

Analisis komponen yang diketahui dan berada bersama-sama komponen lain yang tak diketahui, tetapi menyerap radiasi pada daerah spectral yang sama, merupakan masalah yang sering dihadapi dalam pengukuran. Masalah-masalah tersebut seringkali dapat diselesaikan dengan metode “base-line” seperti terlihat pada gambar di bawah ini (gambar 2.8). Metode ini hanya dapat digunakan apabila spectrum dari komponen yang diketahui relative tajam dan spektrum dari komponen yang tak diketahui betul betul linear pada daerah panjang gelombang yang sama.



Gambar 2.8 Analisis kuantitatif dengan teknik “Base-line”

(catatan: data harus diplot terhadap satuan absorbansi, bukan %T)

- (a) Menggambarkan bagian spectrum dari senyawa X yang mempunyai puncak serapan. Karena konsentrasi X diketahui maka harga Ax dapat dihitung.
- (b) Dengan menggambarkan Base-line harga Ax dapat pula dihitung dari tinggi puncak itu sendiri. Harga ini (Ax) sebanding dengan konsentrasi dan dapat digunakan untuk analisis kuantitatif.
- (c) Jika senyawa X bercampur dengan senyawa Y yang juga menyerap dan mempunyai spectrum yang sederhana seperti yang ditunjukkan oleh garis putus putus pada gambar (c), harga puncak Ax tidak berubah. Akan tetapi puncak secara keseluruhan akan bergeser ke harga absorbansi yang lebih tinggi.
- (d) Jika senyawa X ditentukan dengan adanya senyawa Z yang spectrum nya terlihat sebagai garis putus-putus, akan mengakibatkan perubahan dalam bentuk puncak akan tetapi puncak tersebut tidak berubah.

Dengan menggunakan metode “Base-line” ini maka adanya senyawa matriks contoh dapat dihilangkan sehingga nilai absorbansi yang didapat benar-benar hanya dari analit yang dianalisis (Donald T sawyer, 1950; Sunardi. 2005).

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Metode penelitian

Dalam penelitian ini, vitamin C diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV-Visibel. Contoh uji yang digunakan adalah berasal dari minuman buah kemasan yang sering beredar dipasaran. Sebelumnya dianalisis disaring dahulu untuk menghilangkan bulir-bulir buah yang terdapat dalam minuman buah kemasan tersebut dan selanjutnya diencerkan sepuluh kali dengan menggunakan aquabides.

III.2 Tempat dan waktu

Penelitian dilakukan di laboratorium penelitian Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok. Pengumpulan data dilakukan pada bulan Agustus-November 2011, dilanjutkan pengolahan data bulan September-November 2011.

III.3 Alat dan Bahan

III.3.1 Alat

1. Spektrofotometri UV-Vis Shimadzu 2450 milik Departemen Kimia Universitas Indonesia dengan sistem optik radiasi berkas ganda (double beam).
2. Alat alat gelas seperti: beaker gelas, pipet ukur, pipet gondok, labu ukur, pipet tetes, cuvet
3. bulb
4. neraca analitik
5. botol semprot.
6. Corong
7. Kertas saring

III.3.2 Bahan

Bahan penelitian ini meliputi:

1. Asam askorbat (vitamin C) (s)
2. Asam sitrat (s)
3. Ethanol (aq)
4. Aquabidest (aq)
5. Beberapa sampel minuman buah kemasan dari berbagai merk yang dipilih karena bentuknya larutan dan pada etiketnya tertera kadar vitamin C dalam tiap botolnya.

III.4 Cara Kerja

III.4.1 Preparasi Standar

Larutan induk vitamin C disiapkan dengan menimbang vitamin C sebanyak 25 mg dan dilarutkan dengan aquabidest dalam labu ukur 250ml sehingga konsentrasinya menjadi 100ppm. Kurva kalibrasi vitamin C diperoleh dengan mengencerkan larutan standar induk yang dibuat dengan berbagai macam konsentrasi yaitu 0.1ppm, 0.5ppm, 1ppm, 2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm, 6ppm, 7ppm, 8ppm, 9ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 50ppm, 70ppm, 80ppm (v/v).

III.4.1 Uji stabilitas

Uji stabilitas ini dilakukan dengan mengambil konsentrasi terkecil larutan pada vitamin C yang masih mampu dan masih dapat terbaca dengan baik. Lalu setiap jamnya diukur tinggi absorbansinya, dan dilihat penurunannya.

III.4.2 Uji presisi.

Uji presisi yang dilakukan ada dua:

1. Uji presisi untuk mengetahui ketelitian alat maupun ketelitian praktikan itu sendiri

uji ini dilakukan dengan membuat larutan standar vitamin C yaitu 100ppm, 10ppm, 1ppm, masing-masing larutan tersebut dibuat sebanyak 10 labu ukur. Dari kesepuluh labu ukur tersebut, salah satunya diukur sebanyak 10 kali dan yang lainnya hanya diukur sebanyak satu kali.

2. Uji presisi dilakukan pada deret standar vitamin C dengan berbagai konsentrasi

vitamin C dilakukan pengukuran ulang dengan sedikitnya 10 kali untuk tiap konsentrasi yang dibuat dari pengenceran larutan induk 100ppm.

Konsentrasi yang diukur ialah 0.1ppm, 0.5ppm, 1ppm, 2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm, 6ppm, 7ppm, 8ppm, 9ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 50ppm, 70ppm, 80ppm (v/v) dan larutan induk 100ppm. Larutan standar vitamin C tersebut dimasukkan kedalam labu ukur 100ml dan ditambahkan aquabidest hingga tanda batas, lalu dihomogenkan. Masing-masing larutan dimasukkan kedalam kuvet dan dibaca dengan menggunakan spektrofotometri UV-Visibel. Pengukuran dilakukan secara berulang, kemudian dapat dicari rata rata absorbansi dari standar tersebut dan barulah dapat dicari standar deviasinya.

III.4.3 Uji linieritas dan rentang

Dibuat larutan standard dari vitamin C mengacu pada uji presisi masing-masing konsentrasi larutan vitamin C. Masing-masing konsentrasi dilakukan pengukuran ulang sedikitnya 10 kali dengan alat spektrofotometri UV-Visibel. Dibuat kurva kalibrasi dan persamaan garis linier untuk uji kuantitatif dari sampel yang mengandung vitamin C.

III.4.4 Uji LOD dan LOQ

Dibuat larutan standard vitamin C yang mengacu pada kurva kalibrasi dari standard vitamin C, didapatkan kurva kalibrasi kemudian pengukuran standar dilakukan dari konsentrasi tertinggi sampai dengan konsentrasi yang terendah sampai didapatkan batas dimana alat spektrofotometri UV-Visibel tidak memberikan respon lagi kepada standard.

III.4.5 Uji selektifitas

Disiapkan dengan melarutkan vitamin C dan asam sitrat, sebanyak masing-masing 1mg dan dilarutkan dengan aquabidest dalam labu ukur 100ml, dan ditambahkan aquabidest hingga tanda batas, lalu dihomogenkan sehingga konsentrasinya menjadi 10mg/L.

Lalu, dibuat campuran dari vitamin C dan asam sitrat tersebut dan dibaca kembali dengan menggunakan spektrofotometri UV-Visible. Didapatkan kurva dari campuran vitamin C dan asam sitrat tersebut.

III.4.6 Uji akurasi

Uji akurasi dilakukan melalui uji perolehan kembali. Dilakukan dengan “spiking” yaitu dengan cara menambahkan sejumlah larutan standar vitamin C 10mg kedalam suatu sampel yang kadarnya telah diketahui sebelumnya, dan dianalisa dan memberikan hasil pengukuran yang identik dengan nilai sebenarnya.

III.4.7 Uji sampel

Sampel vitamin C berupa minuman buah kemasan yang dibeli dari berbagai tempat. Sampel yang akan dianalisis dipersiapkan terlebih dahulu, selanjutnya sampel disaring agar mempermudah pada waktu proses pembacaan. Filtrat pada sampel tersebut diambil dan dilakukan pengenceran dengan mengambil 10ml filtrat sampel, diencerkan kedalam labu ukur 100ml

dan dihomogenkan. Setelah semua larutan sampel siap barulah dilakukan pengukuran absorbansi terhadap sampel.

Sampel ini diuji dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-Visibel untuk mendapatkan kadar Vitamin C pada sampel minuman buah kemasan. Lalu tinggi absorban yang ditampilkan pada layar dicatat dan dihitung kadarnya dengan menggunakan persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang tadi telah dibuat, Sehingga bisa diketahui konsentrasi dari sampel tersebut, ini merupakan metode analisis kuantitatif.

III.4.8 Kondisi spektrofotometri

Kondisi spektrofotometri UV-Visibel adalah sebagai berikut:

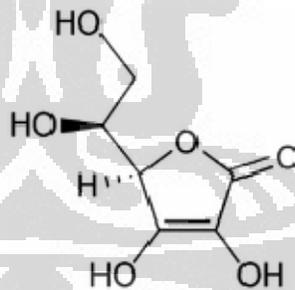
- spektrofotometri UV-Visibel : Shimadzu 2450
- Detektor : photomultiplier tube
- Panjang gelombang : 200-400nm
- Sumber radiasi : lampu deuterium (D_2)
- System optic : spektrofotometer UV-Vis radiasi berkas ganda (*double beam*)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan analisis untuk mengetahui kadar vitamin C didalam minuman buah kemasan yang beredar dipasaran. Analisis dilakukan dengan menggunakan pendekatan metode validasi dengan menggunakan instrumen spektrofotometri UV - Visibel. Instrumen yang digunakan ialah spektrofotometri UV - Visibel merk Shimadzu 2450 milik departemen Kimia, Universitas Indonesia, Depok dengan sumber radiasi Deuterium dan detektor photomultiplier tube.

Analisis organik dengan spektrofotometri UV-Visibel mempunyai keterbatasan, tetapi vitamin C mempunyai gugus yang memiliki elektron ikatan π yang akan memberikan serapan kuat dalam daerah UV apabila terkonyugasi satu dengan lainnya.



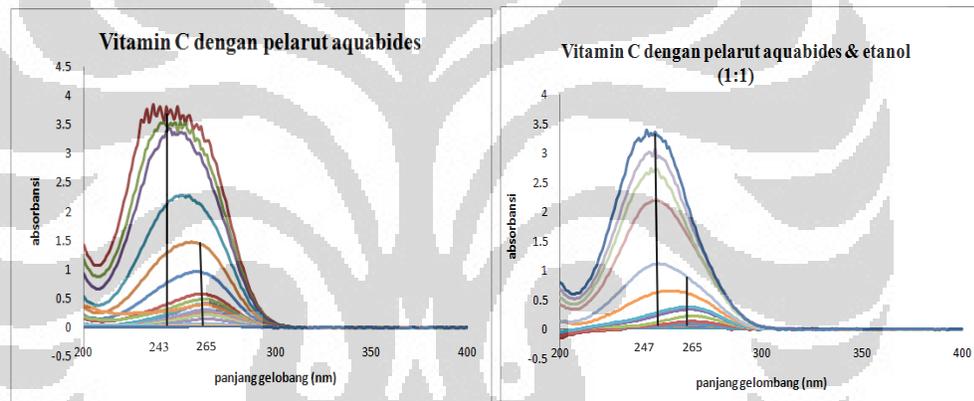
Gambar 4.1 Vitamin C

Kondisi dimulai dengan menentukan panjang gelombang maksimum untuk analisis vitamin C menggunakan spektrofotometri UV-Visibel. Panjang gelombang optimum dengan menggunakan spektrofotometri UV - Visibel dilakukan terhadap larutan standar vitamin C pada rentang panjang gelombang 200 – 400 nm karena molekul-molekul dengan ikatan rangkaplah

yang mempunyai energi eksitasi yang cukup rendah yang menimbulkan penyerapan dalam daerah UV dekat.

Penetapan kadar vitamin C dengan cara spektrofotometri UV-Visibel dilakukan untuk mengetahui pergeseran serapan panjang gelombang maksimum dari vitamin C akibat pengaruh pelarut. Maka dilakukan perbandingan antara dua pelarut yaitu :

1. Dengan menggunakan pelarut aquabidest
2. Dengan menggunakan perbandingan pelarut antara aquabidest dan etanol (1:1)



Gambar 4.2 Vitamin C dengan perbandingan pelarut.

Dari hasil pengukuran yang diperoleh, panjang gelombang maksimum untuk larutan standar vitamin C dapat dilihat pada gambar 4.2. Pada gambar tersebut disertai pula dengan adanya interaksi antara zat terlarut dan pelarut, yang menyebabkan kecenderungan menghasilkan pita serapan yang lebar dalam daerah UV.

Molekul-molekul vitamin C yang memerlukan energi lebih besar untuk promosi elektron, akan menyerap panjang gelombang yang lebih pendek. Sedangkan molekul-molekul vitamin C yang memerlukan energi

yang lebih kecil akan menyerap panjang gelombang yang lebih panjang. Kekuatan suatu asam merupakan kemampuannya menyumbangkan atau melepaskan proton pada molekul air. Asam lemah adalah asam yang tidak terionisasi secara signifikan dalam larutan. Vitamin C merupakan asam lemah yang mempunyai nilai K_a yang kecil (sejumlah kecil H_3O^+ ada dalam larutan; asam hanya terurai sebagian).

Dari hasil pengukuran menunjukkan bahwa perbandingan pelarut yang menggunakan etanol-aquabides (1:1) dapat menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum yang lebih sempit (265 s/d 247 nm) dibandingkan dengan menggunakan pelarut aquabides saja (265 s/d 243 nm). Interaksi antara jenis pelarut berpengaruh nyata terhadap pergeseran panjang gelombang. Hal ini dikarenakan sifat aquabidest yang lebih polar dibandingkan dengan etanol yang memiliki rantai karbon nonpolar, dan juga larut dalam senyawa yang nonpolar. Selain itu sifat etanol yang semi polar dapat membuat pengotor-pengotor (yang bersifat polar) pada vitamin C tersebut menjadi tidak ikut larut didalamnya, sehingga absorbansi yang terbaca hanya vitamin C itu sendiri. Karena pergeseran panjang gelombang tersebut, maka dilakukan pengelompokan konsentrasi standar vitamin C dengan:

1. Vitamin C dengan pelarut aquabides dikelompokkan:
Konsentrasi vitamin C dari 0.607 ppm s/d 30 ppm menyerap panjang gelombang maksimum 265nm, sedangkan pada konsentrasi 30 ppm s/d 100 ppm menyerap panjang gelombang 243nm.
2. Vitamin C dengan pelarut aquabides & etanol (1:1) dikelompokkan:
Konsentrasi vitamin C dari 0.1 ppm s/d 30 ppm menyerap panjang gelombang maksimum 265nm sedangkan pada konsentrasi 30 ppm s/d 100 ppm menyerap panjang gelombang 247nm

Penetapan kadar vitamin C pada pelarut aquabides, dengan menggunakan spektrofotometri UV-Visibel didapatkan hasil perubahan

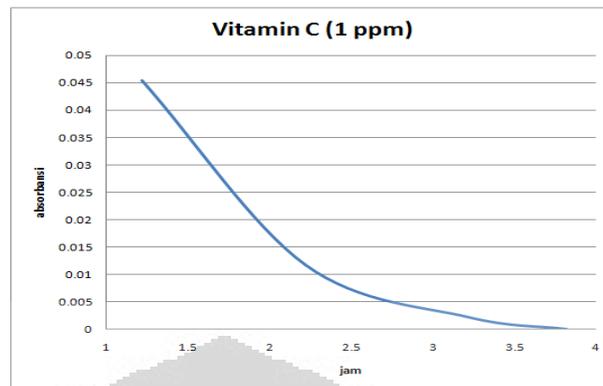
konsentrasi vitamin C dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah, terjadi pergeseran panjang gelombang maksimum dari 243nm (konsentrasi tinggi 30 ppm s/d 100 ppm) ke 265 nm (konsentrasi rendah dari 0.607 ppm s/d 30 ppm) pergeseran ini disebut pergeseran batokromik.

IV.1 Uji Stabilitas

Vitamin C adalah padatan yang berbentuk kristal putih, dan mudah larut dalam air, sedikit larut dalam alkohol dan gliserol, tetapi tidak dapat larut dalam pelarut non polar seperti eter, benzene, kloroform dan lain-lain. Vitamin C adalah zat pereduksi kuat yang dapat bertindak sebagai antioksidan. Dalam keadaan kering vitamin C cukup stabil, tetapi dalam keadaan larut vitamin C mudah rusak, karena bersentuhan dengan udara (teroksidasi), terutama bila terkena panas. Oksidasi dipercepat dengan adanya tembaga dan besi. Vitamin C tidak stabil dalam larutan alkali, tetapi cukup stabil dalam larutan asam. Karena pada kondisi media yang asam akan memperlambat proses oksidasi vitamin C.

Karena vitamin C dalam larutan mudah sekali mengalami kerusakan. Vitamin C secara perlahan lahan dapat teroksidasi menjadi asam dehidroaskorbat, sehingga apabila ingin melakukan pengukuran pada larutan vitamin C maka vitamin C tersebut haruslah selalu dipersiapkan dalam kondisi yang baru dan pengukuran juga harus dilakukan secepat mungkin.

Dapat dilihat pada gambar 4.3 dimana vitamin C dengan konsentrasi 1ppm dalam pelarut aquabides mengalami penurunan tinggi absorbansi di setiap jamnya.



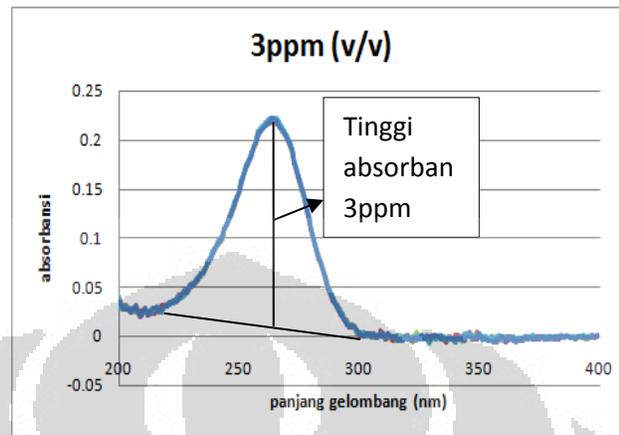
Gambar 4.3 Kurva degradasi vitamin C konsentrasi 1ppm

IV.2 Presisi

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Nilai presisi diwakilkan oleh nilai simpangan deviasi (SD) dan % simpangan deviasi relative (%SRD) dari keterulangan (repeatability). Makin kecil nilai koefisien variasi setelah pengulangan maka makin bagus presisinya.

Analisis kuantitatif pada uji presisi ini digunakan dengan metode base-line. Metode ini hanya dapat digunakan apabila spektrum dari komponent tersebut yang diketahui relative tajam dan spektrum dari komponen yang tak diketahui betul betul linier pada daerah panjang gelombang yang sama. Dengan menggambarkan base line, maka analisis kuantitatif dapat dihitung dari tinggi puncak itu sendiri ke dasar base line yg tadi dibuat. Tinggi absorban yang diperoleh akan sebanding dengan konsentrasi dan dapat digunakan untuk analisis kuantitatif.

Contoh metode base-line:



Gambar 4.4 Metode base line pada konsentrasi vitamin C 3ppm

Uji presisi yang praktikan lakukan ada dua yaitu:

1. Uji presisi untuk mengetahui ketelitian instrumen maupun ketelitian individu itu sendiri.

Untuk mengetahui ketelitian dari instrument, maka dilakukan pengukuran sebanyak 10 kali untuk setiap satu labu ukur vitamin C dengan konsentrasi 10ppm, 10ppm, dan 1ppm. Sedangkan untuk mengetahui ketelitian individu, maka dilakukan dengan membuat larutan vitamin C sebanyak 10 labu ukur pada masing masing konsentrasi yaitu 100ppm, 10ppm, dan 1ppm dan diukur sebanyak satu kali. Lalu dicari rata ratanya dan didapatkan nilai simpangan deviasinya maupun nilai dari persentase simpangan deviasi relatifnya

Dari data yang didapat menunjukkan bahwa ketelitian dari instrumen tersebut masih cukup baik untuk digunakan. Sedangkan ketelitian praktikan jauh lebih rendah dibandingkan dengan instrumen. Hal ini dapat dilihat dari nilai dari persentase simpangan deviasi relatifnya yang cenderung menurun seiring dengan semakin kecilnya konsentrasi.

Tabel 4.1 Uji presisi untuk analisis instrumen

| 1 labu diukur sepuluh kali | | | |
|----------------------------|------------|-------|-------|
| konsentrasi | absorbansi | SD | %RSD |
| 100ppm | 2.747 | 0.028 | 1.023 |
| 10ppm | 0.366 | 0.003 | 0.829 |
| 1ppm | 0.049 | 0.002 | 3.651 |

Tabel 4.2 Uji presisi untuk analisis individu

| 10 labu diukur satu kali | | | |
|--------------------------|------------|-------|--------|
| konsentrasi | absorbansi | SD | %RSD |
| 100ppm | 2.735 | 0.032 | 1.159 |
| 10ppm | 0.393 | 0.061 | 15.438 |
| 1ppm | 0.025 | 0.010 | 39.292 |

2. Uji presisi dilakukan pada deret standar vitamin C dengan berbagai konsentrasi

Masing-masing deret standar Vitamin C yang diukur pada berbagai macam konsentrasi presisi pada rentang daerah linier 0,1ppm (v/v) sampai dengan konsentrasi 100ppm, yaitu 0.1ppm, 0.5ppm, 1ppm, 2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm, 6ppm, 7ppm, 8ppm, 9ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 50ppm, 70ppm, 80ppm (v/v) yang dibuat dari larutan induk 100ppm. Presisi yang diperoleh dari pengulangan sebanyak sepuluh kali dengan waktu yang sama dan pada kondisi operasi instrument spektrofotometri yang sama atau dengan jangka waktu yang dekat.

Hasil yang didapat pada uji presisi vitamin C ini adalah:

Tabel 4.3 Uji presisi untuk kurva standar linieritas

| konsentrasi | Absorbansi | | 265nm | | 243nm | |
|-------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 265nm | 243nm | SD | RSD% | SD | RSD% |
| 0.1 | 0.008 | | 0.001 | 5.436 | | |
| 0.5 | 0.041 | | 0.001 | 2.116 | | |
| 1 | 0.052 | | 0.001 | 2.507 | | |
| 2 | 0.145 | | 0.002 | 1.094 | | |
| 3 | 0.213 | | 0.004 | 2.017 | | |
| 4 | 0.262 | | 0.004 | 1.609 | | |
| 5 | 0.292 | | 0.005 | 1.837 | | |
| 6 | 0.289 | | 0.006 | 2.087 | | |
| 7 | 0.389 | | 0.006 | 1.550 | | |
| 8 | 0.400 | | 0.007 | 1.684 | | |
| 9 | 0.444 | | 0.008 | 1.899 | | |
| 10 | 0.534 | | 0.004 | 0.657 | | |
| 20 | 0.912 | | 0.017 | 1.849 | | |
| 30 | 1.260 | 1.115 | 0.021 | 1.673 | 0.025 | 2.217 |
| 50 | | 1.950 | | | 0.043 | 2.207 |
| 70 | | 2.913 | | | 0.053 | 1.810 |
| 80 | | 2.945 | | | 0.059 | 1.993 |
| 100 | | 3.057 | | | 0.074 | 2.413 |

Dari data diatas pada tabel 4.3 bahwa nilai persentase deviasi standar relative pada konsentrasi-konsentrasi ini lebih rendah dari syarat yang ditetapkan, jadi dapat disimpulkan bahwa instrumen spektrofotometri UV-Visibel tersebut masih cukup baik untuk digunakan.

IV.3 Linieritas

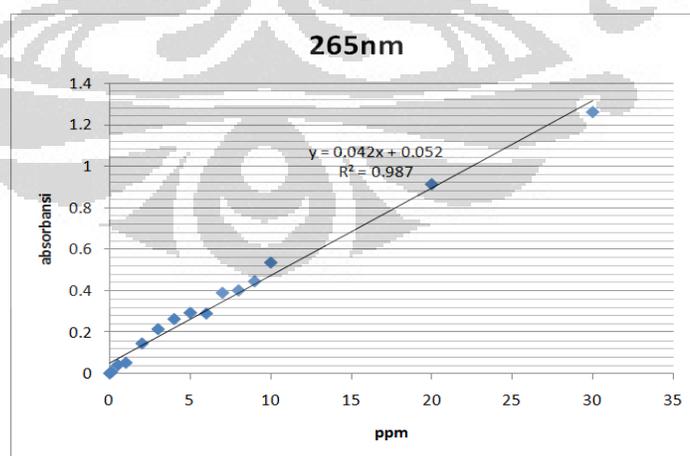
Linieritas senyawa vitamin C ditetapkan dengan membuat deret standar sebanyak 14 konsentrasi pada rentang 0.1ppm (v/v) sampai dengan 30ppm (v/v) pada panjang gelombang 265 nm, sedangkan sebanyak 5

konsentrasi pada rentang 30 ppm (v/v) sampai dengan 100ppm pada panjang gelombang 243nm.

Berikut adalah tabel dan grafik persamaan linier dari standar vitamin C dengan pelarut aquabidespada panjang gelombang 265nm untuk konsentrasi rendah (0.1ppm s/d 30ppm):

Tabel 4.4 Konsentrasi standar vitamin C (265nm)

| Konsentrasi (ppm) | absorbansi (265nm) |
|-------------------|--------------------|
| 0 | 0 |
| 0.1 | 0.008 |
| 0.5 | 0.041 |
| 1 | 0.052 |
| 2 | 0.145 |
| 3 | 0.213 |
| 4 | 0.262 |
| 5 | 0.292 |
| 6 | 0.289 |
| 7 | 0.389 |
| 8 | 0.400 |
| 9 | 0.444 |
| 10 | 0.534 |
| 20 | 0.912 |
| 30 | 1.260 |

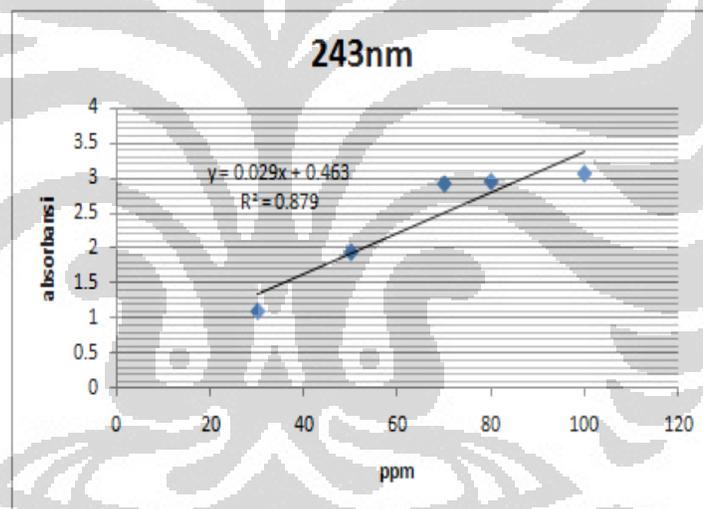


Gambar 4.5 Persamaan linier konsentrasi 0.1ppm s/d 30ppm (265nm)

Berikut adalah tabel dan grafik persamaan linier dari standar vitamin C dengan pelarut aquabidespada panjang gelombang 243nm untuk konsentrasi tinggi (30ppm s/d 100ppm):

Tabel 4.5 Konsentrasi standar vitamin C (243nm)

| Konsentrasi (ppm) | Absorbansi (243nm) |
|-------------------|--------------------|
| 30 | 1.115 |
| 50 | 1.950 |
| 70 | 2.913 |
| 80 | 2.945 |
| 100 | 3.057 |



Gambar 4.6 Persamaan linier vitamin C konsentrasi 30ppm s/d 100ppm (243nm)

Pada panjang gelombang 265 nm dibuat rentang linier dari konsentrasi 0,1ppm (v/v) sampai dengan 30ppm (v/v) memberikan persamaan linier $y=0.054+0.006$ dengan regresi linier ($R^2= 0,987$). Sedangkan pada panjang gelombang 243nm dibuat rentang linier dari 30ppm (v/v) sampai dengan 100ppm memberikan persamaan linier $y=0,029x+0,463$ dengan regresi linier

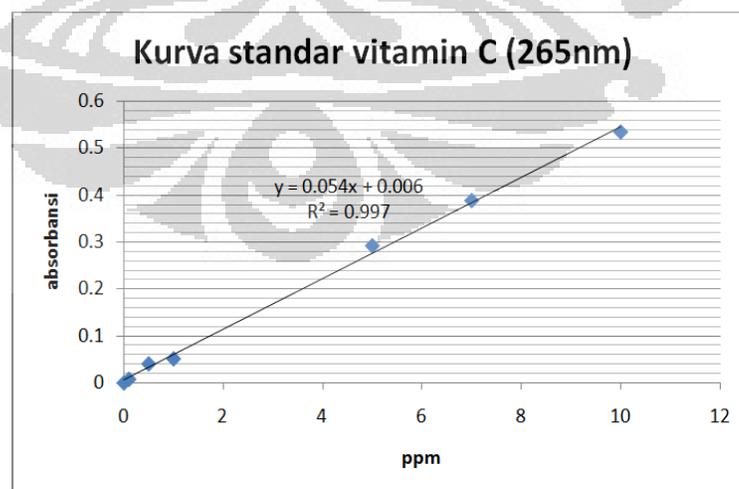
($R^2 = 0,897$). Pada rentang daerah ini adalah kurang linier sehingga perlu dicari daerah linier untuk melakukan kerja.

Pembuatan daerah linier ini bertujuan untuk mengetahui daerah rentang kerja yang baik dari kelinieran standar vitamin C. Hal ini sangat perlu dilakukan karena pada daerah ini akan didapatkan metode validasi yang tepat dari analisis suatu analit. Uji kelinieran ini digunakan suatu larutan baku standar asam vitamin C dengan rentang konsentrasi yang berbeda.

Pada rentang linier ini dibuat suatu garis linier dari konsentrasi versus absorbansi. Berikut persamaan linier dari standar vitamin C:

Tabel 4.6 Konsentrasi linier standar vitamin C (265nm)

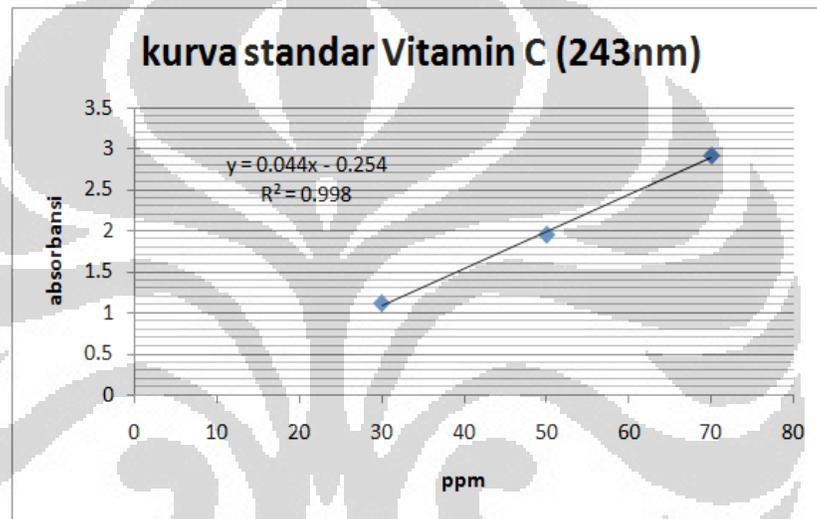
| Konsentrasi (ppm) | absorbansi (265nm) |
|-------------------|--------------------|
| 0 | 0 |
| 0.1 | 0.008 |
| 0.5 | 0.041 |
| 1 | 0.052 |
| 5 | 0.292 |
| 7 | 0.389 |
| 10 | 0.534 |



Gambar 4.7 Persamaan linier untuk Vitamin C (265nm)

Tabel 4.7 Konsentrasi linier standar vitamin C (243nm)

| Konsentrasi (ppm) | Absorbansi (243nm) |
|----------------------|-----------------------|
| 30 | 1.115 |
| 50 | 1.950 |
| 70 | 2.913 |



Gambar 4.8 Persamaan linier untuk vitamin C (243nm)

Menurut uji kelinearan, pada panjang gelombang 265nm, maka dilakukan pembuangan data pada beberapa konsentrasi 2ppm, 3ppm, 4ppm, 6ppm, 8ppm, 9ppm, 20ppm, 30ppm (v/v). Sedangkan pada panjang gelombang 243nm dilakukan pembuangan data pada konsentrasi 80ppm (v/v) dan 100ppm. Hal ini dikarenakan data-data tersebut berada diluar daerah rentang kerja, maka data tersebut harus dibuang.

Dari data di atas didapatkan nilai absorbansi yang berada pada rentang linier yang diperkenankan yaitu $y = 0.054x + 0.006$ dengan nilai regresi linier mengalami peningkatan yaitu ($R^2 = 0,997$) untuk panjang gelombang 265nm dan $y = 0,044x - 0,254$ dengan nilai regresi linier mengalami peningkatan yaitu

($R^2 = 0,998$) untuk panjang gelombang 243nm. Daerah ini memiliki regresi linier yang lebih tinggi dari regresi linier yang ditetapkan yaitu $R \geq 0,995$ pada kelayakan suatu metode analisis. Pada rentang linier ini menunjukkan bahwa daerah ini adalah daerah respon linier suatu validasi metode penetapan kadar senyawa dalam suatu analit.

Tabel 4.8 Standar deviasi untuk persamaan linier vitamin C (265nm)

| n | x_i | y_i | x^2 | $(x_i - \bar{x})^2$ | y^2 | $x_i y_i$ | \bar{y} | $(y_i - \bar{y})^2$ |
|---------------|----------|----------|--------|---------------------|----------|-----------|-----------|---------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 11.36653 | 0 | 0 | 0.006 | 0.000036 |
| 2 | 0.1 | 0.007836 | 0.01 | 10.70225 | 6.14E-05 | 0.000784 | 0.0114 | 1.27E-05 |
| 3 | 0.5 | 0.040667 | 0.25 | 8.245105 | 0.001654 | 0.020333 | 0.033 | 5.88E-05 |
| 4 | 1 | 0.0515 | 1 | 5.623676 | 0.002652 | 0.0515 | 0.06 | 7.22E-05 |
| 5 | 5 | 0.292222 | 25 | 2.652244 | 0.085394 | 1.461111 | 0.276 | 0.000263 |
| 6 | 7 | 0.388571 | 49 | 13.16653 | 0.150988 | 2.72 | 0.384 | 2.09E-05 |
| 7 | 10 | 0.534444 | 100 | 43.93795 | 0.285631 | 5.344444 | 0.546 | 0.000134 |
| <u>jumlah</u> | 23.6 | 1.31524 | 175.26 | 95.69429 | 0.52638 | 9.598172 | 1.3164 | 0.000597 |
| rata | 3.371429 | 0.187891 | | | | | | |

Tabel 4.9 Standar deviasi untuk persamaan linier vitamin C (243nm)

| n | x_i | y_i | x^2 | $(x^2 - x_i)^2$ | y^2 | $x_i y_i$ | \bar{y} | $(y_i - \bar{y})^2$ |
|---------------|-------|--------|-------|-----------------|----------|-----------|-----------|---------------------|
| 1 | 30 | 1.115 | 900 | 400 | 1.243225 | 33.45 | 1.066 | 0.002401 |
| 2 | 50 | 1.95 | 2500 | 0 | 3.8025 | 97.5 | 1.946 | 1.6E-05 |
| 3 | 70 | 2.9125 | 4900 | 400 | 8.482656 | 203.875 | 2.826 | 0.007482 |
| <u>jumlah</u> | 150 | 5.9775 | 8300 | 800 | 13.52838 | 334.825 | 5.838 | 0.009899 |
| rata | 50 | 1.9925 | | | | | | |

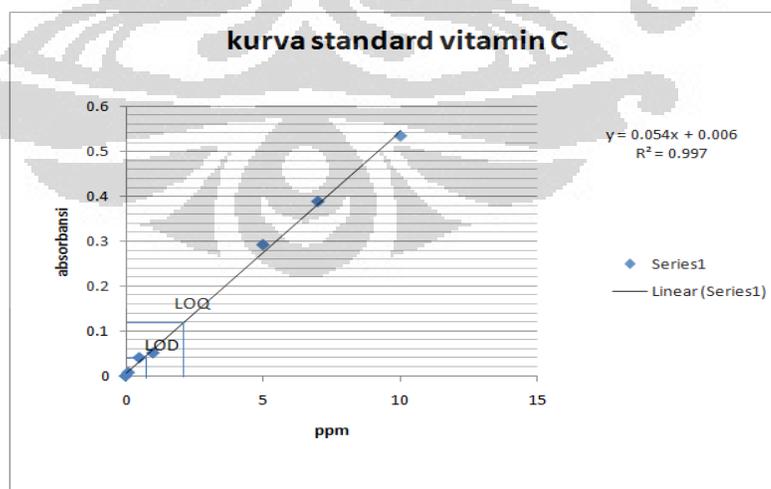
Berdasarkan rentang linier (265nm) $y = 0.054x + 0.006$ didapatkan sesuai perhitungan pada table 4.3 standar deviasi adalah 0,011 dan standar deviasi untuk nilai $b = 0,054 \pm 0,001$ dan nilai standar deviasi untuk nilai $a = 0.006 \pm 0,006$. Sedangkan berdasarkan rentang linier (243nm) $y = 0,044x - 0,254$ didapatkan sesuai perhitungan pada table 4.4 standar deviasi adalah 0.099 dan standar deviasi untuk nilai $b = 0,044 \pm 0.004$ dan nilai standar deviasi untuk nilai $a = -0.254 \pm 0.185$.

IV.4 Batas deteksi dan Batas kuantisasi

Dari hasil persamaan linier vitamin C yaitu $y = 0.054x + 0.006$, dapat dicari batas deteksi maupun batas kuantisasinya. Dimana batas deteksi merupakan konsentrasi analit terendah yang mampu menghasilkan signal cukup besar sehingga mampu terdeteksi dan dapat dibedakan dengan signal blanko dengan tingkat kepercayaan 99%. Batas kuantisasi merupakan konsentrasi analit yang menghasilkan signal lebih besar dari blanko atau jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi criteria cermat dan seksama dan dapat dikuantifikasi dengan akurasi dan presisi yang baik.

Tabel 4.10 LOD dan LOQ untuk persamaan linier vitamin C

| n | x_i | y_i | \bar{y} | $(y_i - \bar{y})^2$ | LOD | LOQ |
|---------------|-------|---------|-----------|---------------------|----------|----------|
| 1 | 0 | 0 | 0.006 | 3.6E-05 | | |
| 2 | 0.1 | 0.00784 | 0.0114 | 1.27E-05 | | |
| 3 | 0.5 | 0.04067 | 0.033 | 5.88E-05 | | |
| 4 | 1 | 0.0515 | 0.06 | 7.22E-05 | | |
| 5 | 5 | 0.29222 | 0.276 | 0.00026 | | |
| 6 | 7 | 0.38857 | 0.384 | 2.09E-05 | | |
| 7 | 10 | 0.53444 | 0.546 | 0.00013 | | |
| <u>jumlah</u> | 23.6 | 1.31524 | 1.3164 | 0.0006 | 0.607221 | 2.024074 |



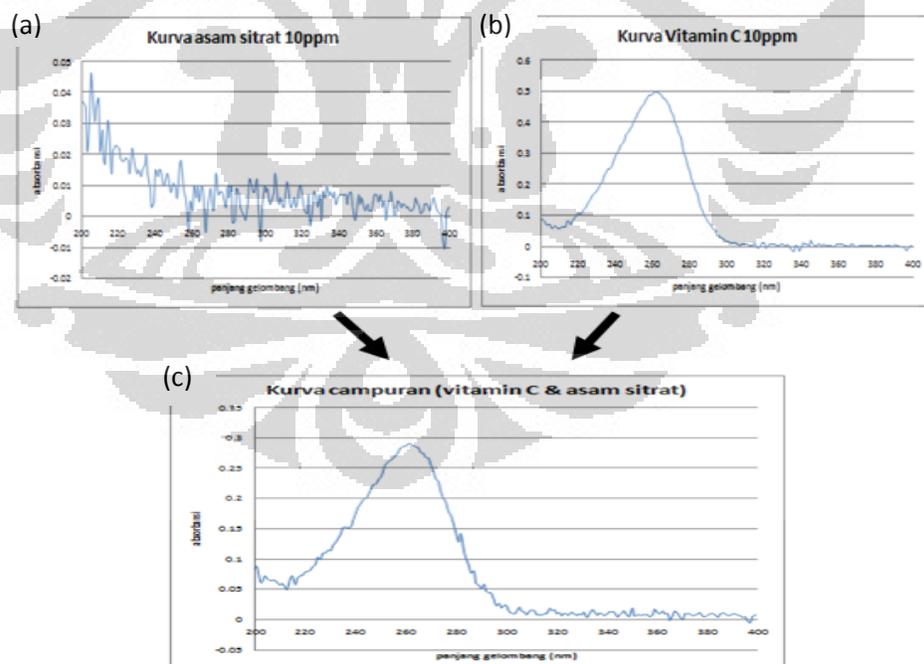
Gambar 4.9 Grafik uji LOD dan LOQ

Dari hasil perhitungan secara statistic menggunakan persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh dari table 4.5 dengan rentang konsentrasi larutan standar vitamin C dari 0.1ppm s/d 10 ppm (v/v) , maka diperoleh nilai LOD 0.607 ppm dan nilai LOQ adalah 2.024 ppm.

IV.5 Uji Selektifitas

Uji selektifitas dari vitamin C bertujuan untuk mengetahui perubahan bentuk kurva maupun pergeseran panjang gelombang vitamin C tersebut terhadap akibat penambahan senyawa asam sitrat. Karena pada dasarnya asam sitrat tersebutlah yang sering digunakan sebagai pengganti vitamin C pada minuman buah kemasan.

Berikut adalah kurva dari asam sitrat dan vitamin C , yang dibuat konsentrasinya masing-masing sebesar 10 ppm.



Gambar 4.10 Grafik (a) asam sitrat 10ppm (b) vitamin C 10ppm (c) percampuran antara vitamin C dengan asam sitrat.

Dari analisis kurva vitamin C tersebut, jika ditambahkan asam sitrat kedalamnya tidak terjadi perubahan kurva maupun panjang gelombang dari vitamin C itu sendiri. Hal tersebut menandakan bahwa asam sitrat tidak memberikan pengaruh bentuk apapun terhadap kurva vitamin C, dapat dilihat pada gambar 4.10.

IV.6 Uji sampel

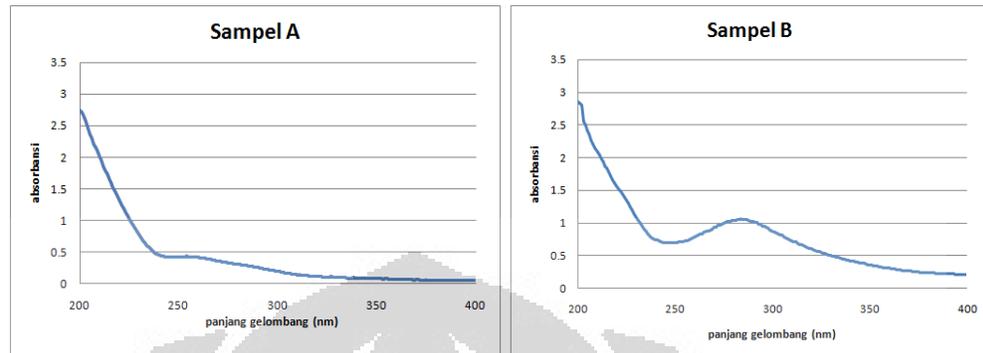
Pada penetapan uji sampel dilakukan dengan cara mengencerkan minuman buah kemasan tersebut sebanyak sepuluh kali agar didapat kurva yang bagus, dan tidak menghasilkan noise lagi. Analisis kuantitatif pada uji sampel ini digunakan dengan metode base-line. Dengan menggunakan metode “Base-line” ini maka adanya senyawa matriks contoh dapat dihilangkan sehingga nilai absorban yang didapat benar-benar hanya dari analit yang dianalisis.

Dari data ini dapat disimpulkan bahwa kadar yang tertera pada kemasan tidak sesuai dengan apa yang diharapkan.

Tabel 4.11 Kadar vitamin C dalam sampel minuman buah kemasan

| sampel | kadar (ppm) | kadar *fp (ppm) | sd | % rsd |
|--------|---------------------------------|-----------------|-------|-------|
| 1 | dibawah limit deteksi | | | |
| 2 | 1.716 | 17.156 | 0.336 | 1.961 |
| 3 | 6.795 | 67.954 | 0.391 | 0.575 |
| 4 | 1.588 | 15.880 | 0.229 | 1.443 |
| 5 | dibawah limit deteksi 0.607 ppm | | | |
| 6 | 1.782 | 17.824 | 0.414 | 2.323 |
| 7 | dibawah limit deteksi 0.607 ppm | | | |
| 8 | 1.745 | 17.450 | 0.340 | 1.946 |
| 9 | dibawah limit deteksi 0.607 ppm | | | |
| 10 | 4.536 | 45.356 | 0.007 | 0.016 |
| 11 | 4.501 | 45.009 | 0.174 | 0.388 |
| 12 | 4.633 | 46.330 | 0.058 | 0.124 |
| 13 | 2.333 | 23.333 | 0.604 | 2.587 |
| 14 | 4.112 | 41.116 | 0.205 | 0.498 |
| 15 | dibawah limit deteksi 0.607 ppm | | | |
| 16 | 3.420 | 34.204 | 0.817 | 2.388 |
| 17 | 6.795 | 6.795 | 0.552 | 1.980 |

Contoh grafik sampel:



Gambar 4.11 Grafik sampel A dan B yang diencerkan sepuluh kali

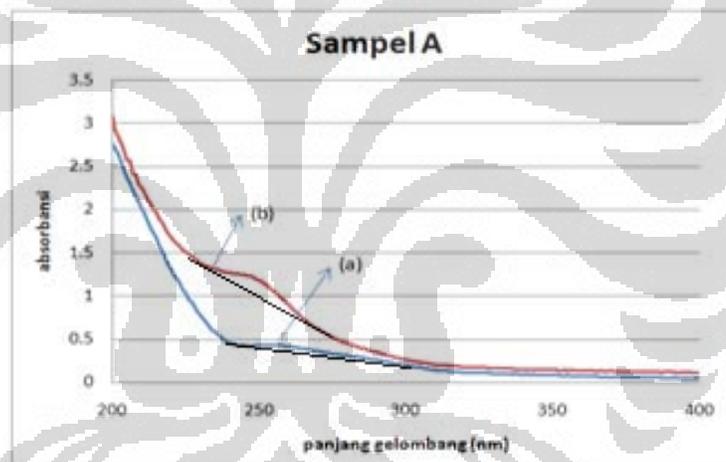
Dapat dilihat dari spectrum serapan pada sampel A yang diperoleh tidak terlalu terlihat kemunculan peak pada panjang gelombang 265 nm. Hal ini bisa dikarenakan sifat vitamin C yang sangat mudah dioksidasi. Selain terurai menjadi asam dehidroaskorbat, dan tidak menutup kemungkinan ada vitamin C yang telah terurai menjadi asam treonik dan asam oksalat yang reaksinya bersifat irreversible (Thurnham dkk, 2000).

Dari gambar 4.11 pada sampel A menghasilkan tinggi absorbansi pada panjang gelombang 265 nm yaitu 0,053. Untuk mendapatkan kadar sampel, maka tinggi absorbansi tersebut dimasukkan kembali kedalam persamaan linear $y=0.054x+0,006$. Kadar yang didapat dikalikan dengan factor pengenceran (10x) yaitu 8,65 ppm sedangkan kadar vitamin C yang tertera pada kemasan adalah 90mg dalam kemasan 200ml. Dan Pada sampel B menghasilkan tinggi absorbansi pada panjang gelombang 265 nm yaitu 0,013. Untuk mendapatkan kadar sampel, maka tinggi absorbansi tersebut dimasukkan kembali kedalam persamaan linear $y=0.054x+0,006$. Kadar yang didapat dikalikan dengan factor pengenceran (10x) yaitu 1,326 mg. sedangkan kadar vitamin C yang tertera pada kemasan adalah 10.39mg dalam kemasam 200ml.

IV.7 Uji Perolehan Kembali

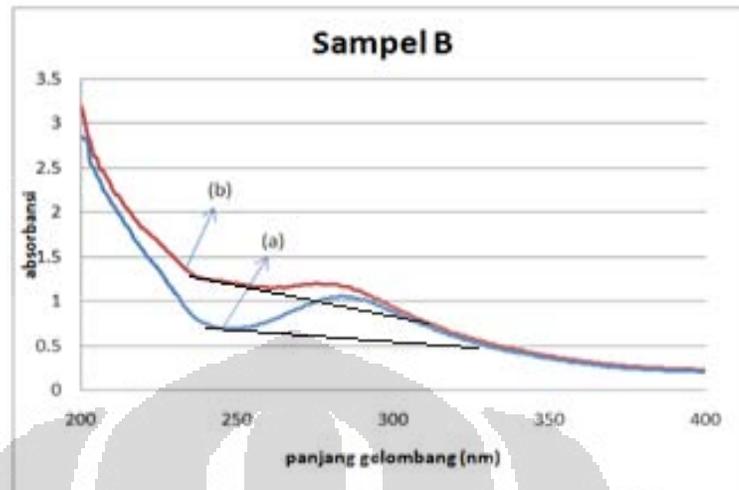
Uji perolehan kembali ini dilakukan dengan penambahan sejumlah konsentrasi tertentu standar vitamin C yang telah diketahui kedalam sampel dan memperlakukannya sama seperti uji sampel tersebut. Penambahan sejumlah tertentu standar vitamin C yang telah diketahui kedalam 10ml larutan sampel yaitu sebesar 10 mg vitamin C dalam labu ukur 100ml dan diencerkan dengan menggunakan pelarut aquabidest. Hal ini bertujuan untuk memastikan ada atau tidaknya peak senyawa vitamin C tersebut dan juga sebagai uji keandalan metoda.

Dari penelitian ini diperoleh persen perolehan kembali yaitu:



Gambar 4.12 Grafik (a) sampel A yang diencerkan sepuluh kali (b) sampel A yang ditambahkan standar vitamin C 10ppm

Dengan adanya penambahan standar vitamin C sebesar 0.001 g, maka pada panjang gelombang 265 nm, akan terjadi peningkatan absorbansi yang cukup significant yaitu diperoleh tinggi absorbansi untuk sampel A adalah 0.105. Tinggi absorbansi tersebut dimasukkan kembali kedalam persamaan linier $y = 0.054x + 0.006$. Kadar diperoleh dengan mengalikan factor pengenceran (10x) yaitu sebesar 18.382 mg/L. Kenaikan absorbansi ini dapat dihitung dengan uji perolehan kembali yaitu 97,47%



Gambar 4.13 Grafik (a) sampel B yang diencerkan sepuluh kali (b) sampel B yang ditambahkan standar vitamin C 10ppm

Dengan adanya penambahan standar vitamin C sebesar 0.001 g, maka pada panjang gelombang 265 nm, akan terjadi peningkatan absorbansi yang cukup significant yaitu diperoleh tinggi absorbansi untuk sampel B adalah 0,066. Tinggi absorban tersebut dimasukkan kembali kedalam persamaan linier $y = 0.054x + 0.006$. Kadar diperoleh dengan mengalikan factor pengenceran (10x) yaitu sebesar 11,072mg/L. Kenaikan absorbansi ini dapat dihitung dengan uji perolehan kembali yaitu 97,4%.

BAB V

KESIMPULAN

1. Metode analisis dengan menggunakan spektrofotometri UV-Visible merupakan metode yang baik digunakan dalam penentuan kadar vitamin C pada minuman buah kemasan, dan hasil validasi didapatkan :
 - vitamin C pada konsentrasi 0.607 s/d 30 ppm dengan panjang gelombang 265nm, didapat persamaan linier yaitu $y=0.054x+0.006$ dengan ($R^2=0.997$), dan standar deviasi 0,011.
Untuk nilai LOD 0.607 ppm, nilai LOQ adalah 2.024 ppm.
 - vitamin C pada konsentrasi 30 s/d 100 ppm dengan panjang gelombang 243nm, didapat persamaan linier yaitu $y=0,044x-0,254$ dengan ($R^2=0,998$), dan standar deviasi adalah 0.099.
2. Dari hasil analisis sampel didapatkan ketidaksesuaian kadar vitamin C terhadap yang tercantum dalam kemasan tersebut. Karena vitamin C dalam larutan mudah sekali mengalami kerusakan. Vitamin C secara perlahan-lahan dapat teroksidasi menjadi asam dehidroaskorbat, sehingga apabila ingin melakukan pengukuran pada larutan vitamin C maka vitamin C tersebut haruslah selalu dipersiapkan dalam kondisi yang baru dan pengukuran juga harus dilakukan secepat mungkin.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan hal hal sebagai berikut:

1. Dilakukannya pengaplikasian pelarut pada semua uji untuk vitamin C dengan menggunakan pelarut etanol murni agar diperoleh pergeseran panjang gelombang di daerah UV tidak terlalu lebar.
2. Sebaiknya dilakukan pengukuran kadar vitamin C tidak hanya sebatas pada minuman saja, yaitu termasuk makanan maupun suplemen yang beredar dipasaran.



DAFTAR PUSTAKA

- AOAC Guidelines for single laboratory : Validation of chemical Methods for Dietary supplements and botanicals.
- Ausman L. M. (1999) *Criteria and recommendation for vitamin c intake* (brief critical review). *Nutr. Rev.* 57, 222-224
- Carr A. C., and Frei B. (1999) Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effect in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1086-1107.
- Chan, Chung Chhown., Herman Lam, Y. C. Lee, Xue Ming Zhang (ed). 2004 *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*. John Wiley & sons , Inc Publication. New Jersey.
- Combs G. F (1992) vitamin C dalam *The vitamins, fundamental aspects in nutrition and health*, 223-249. Divisi academic press. Inc. San Diego, California.
- Day,R.A Jr & A.L Underwood, 1998, *Analisis Kimia Kuantitatif ed ke 6, alih bahasa oleh Dr,Iris Sopyan . M Eng. Penerbit Erlangga;*
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia (1995) *Daftar komposisi zat gizi pangan Indonesia*, hal 9-52.
- Donald T sawyer, Jawnice Mbeebe, William R Heineman. February 1950. Chemistry experiments for instrumental methods. University of Pittsburgh
- Dwi Koko Pratoko. 2007. Validasi metode spektrofotometri UV-Vis dalam penetapan kadar campuran asam askorbat dan α -tokoferol asetat secara simultan dalam obat-obatan

Harmita, 2004. "petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya." Majalah ilmu kefarmasian, Vol. I, No. 3, Hal 117-135.

Heseker dan Schneider R. (1994) Requirements and supply of vitamin C, E, and B carotene for elderly men and women. *Euro J. Clin. Nutr.* 48, 118-127.

http://id.wikipedia.org/wiki/Asam_askorbat

International conference on Harmonization of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use, 1998, Validation of Analytical procedures: methodology.

Jurnal, Isaac M. Ndlovu the use of analytical method of validation to compare results obtained using Boreal Laser HF Analyse and Isokinetic Sampling Technique.

Kanta, Subrata, Julia. 2006. Validasi Metode Analisis. Pusat Penelitian Kimia LIPI

Levine M., Dhariwal K. R., Welch R. W., Wang Y., dan Park J.B. (1995) Determination of optimal Vitamin C requirements in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (suppl), 1347S-1356S.

M. M. Rahman A simple UV-Spectrophotometric method for the determination of Vitamin C Content in Various and Vegetables tablet at Shylet Area in Bangladesh. *Journal of Biological Science* 6(2): 388-392, 2006. ISSN 1727-3048.

M. MizanurRahman. Analysis of Vitamin C (Ascorbic Acid) Contents in Various fruit and Vegetables by UV-spectrophotometry. *Bangladesh. J. Sci. Ind. Res.* 42(4), 417-424, 2007.

Machlin L.J., dan Bendich A., (1987) free radical tissue damage : protective role of antioxidant nutrient. *FASEB J.* 1, 441-445.

- Matilainen T., Vartiainen E., Puska P., Alfthan G., Pokusajeva S., Moisejeva N., dan Uhanov M. 1996. Plasma ascorbic acid concentrations in the republic of Karelia, Rusia, and in North Karelia, Finlandia. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50, 115-120.
- Muhilal, Jus'at I., Djalal F., dan Tarjowo (1998) Angka kecukupan gizi yang dianjurkan, dalam *risalah widyakarya pangan dan gizi VI* ed, hal 877, LIPI, Jakarta.
- Mulya, 1994. Muhammad. Suharman. *Analisis Instrumental*. Perpustakaan departemen Kimia FMIPA UI, Depok.
- Narins D. M. C (1996) vitamin dalam *Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy* (Mahlan L.K., and Stumps S.E., eda) 9th ed, hal 110-4.
- Niki E., Noguchi N., Tsuschihashi H., Gotoh N. (1995) Interaction among vitamin C, vitamin E and B carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (suppl), 1322S-1326S.
- "*Safety (MSDS) data for ascorbic acid*". Oxford University.
- Schetman G., Byrd J. C., dan Gruchow H.W. (1989) The influence of smoking on Vitamin C status in adult. *Am. J. Public health.* 79, 158-162.
- Skoog D.A & D.M. West , F. J. Holler, 1996, Fundamentals of Analytical Chemistry 7th ed. Saunders Col. Publishing.*
- Sumardi. 2005. Tinjauan Umum Validasi metode Analisis. Pusat Penelitian Kimia LIPI Bandung.
- Sunardi. 2005. Penuntun Praktikum Kimia Analisan Instrumentasi. Universitas Indonesia. FMIPA UI, Depok.
- Taylor A. (1993) Relationships between nutrition and oxidation. *J. Am. Coll. Nutr.* 12, 138-146.

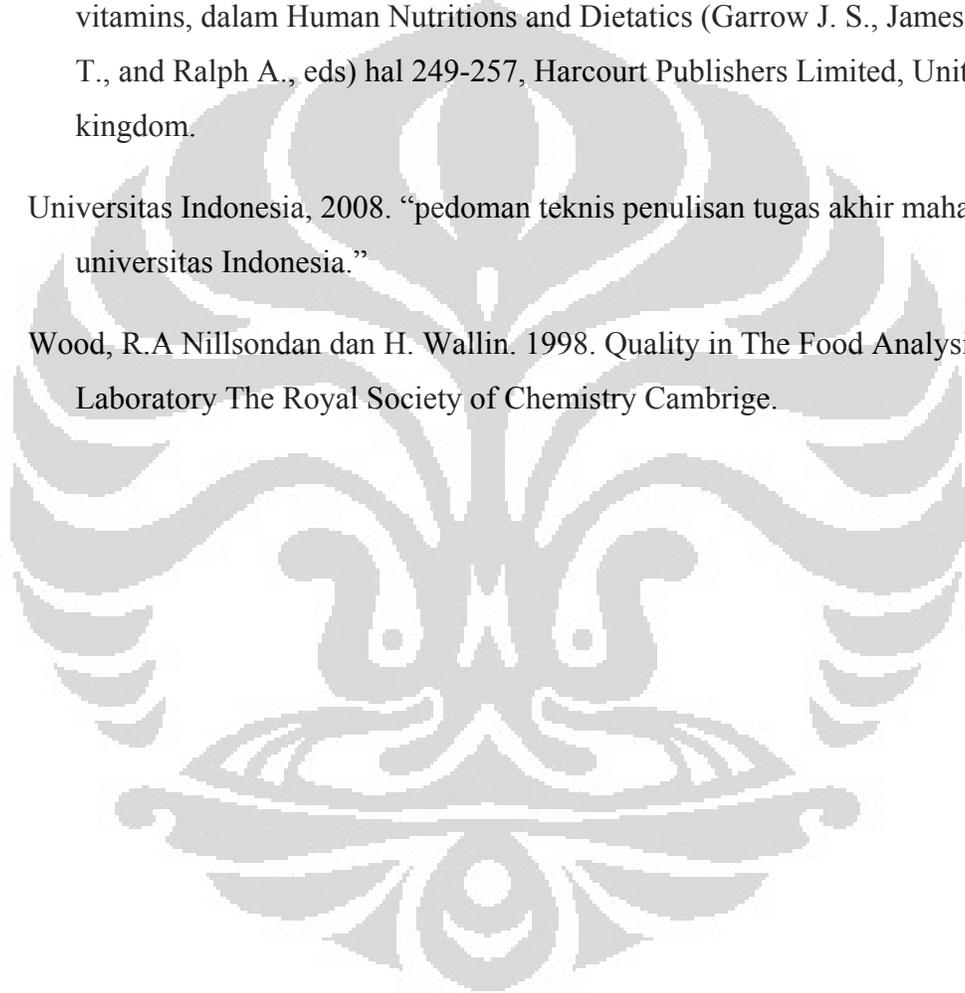
Taylor K. John. 1987. *Quality assurance of chemical measurement*. Florida: lewis publisher Inc.

Tetrasari, Hermini. 2003. *Validasi Metode Analisis*. Pusat Pengkajian Obat dan Makanan BPPOM.

Thurnham D. I., Bender D. A., Scott J., dan Halsted C.H. (2000) Water soluble vitamins, dalam *Human Nutritions and Dietatics* (Garrow J. S., James W. P. T., and Ralph A., eds) hal 249-257, Harcourt Publishers Limited, United kingdom.

Universitas Indonesia, 2008. "pedoman teknis penulisan tugas akhir mahasiswa universitas Indonesia."

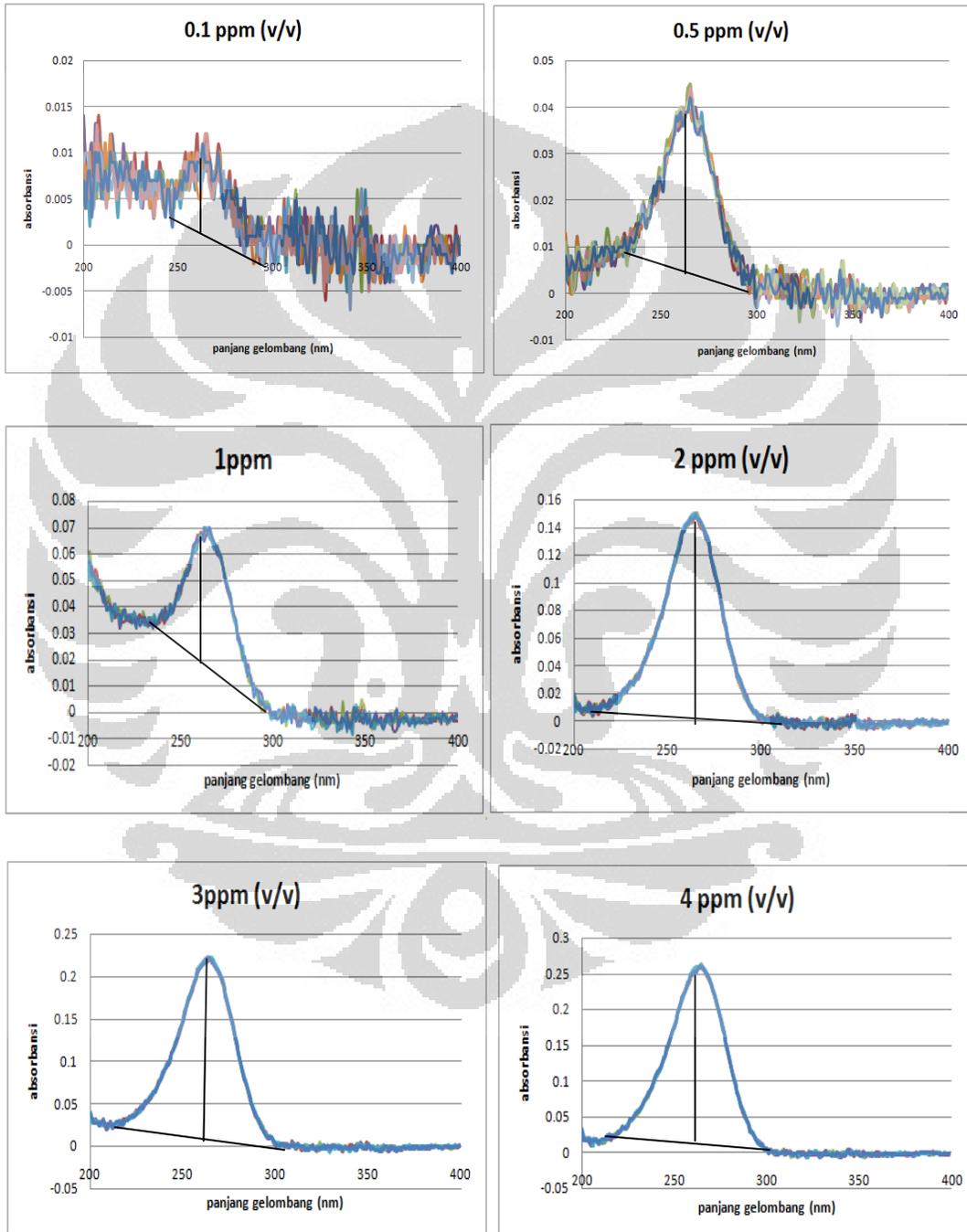
Wood, R.A Nillson dan H. Wallin. 1998. *Quality in The Food Analysis Laboratory* The Royal Society of Chemistry Cambrige.

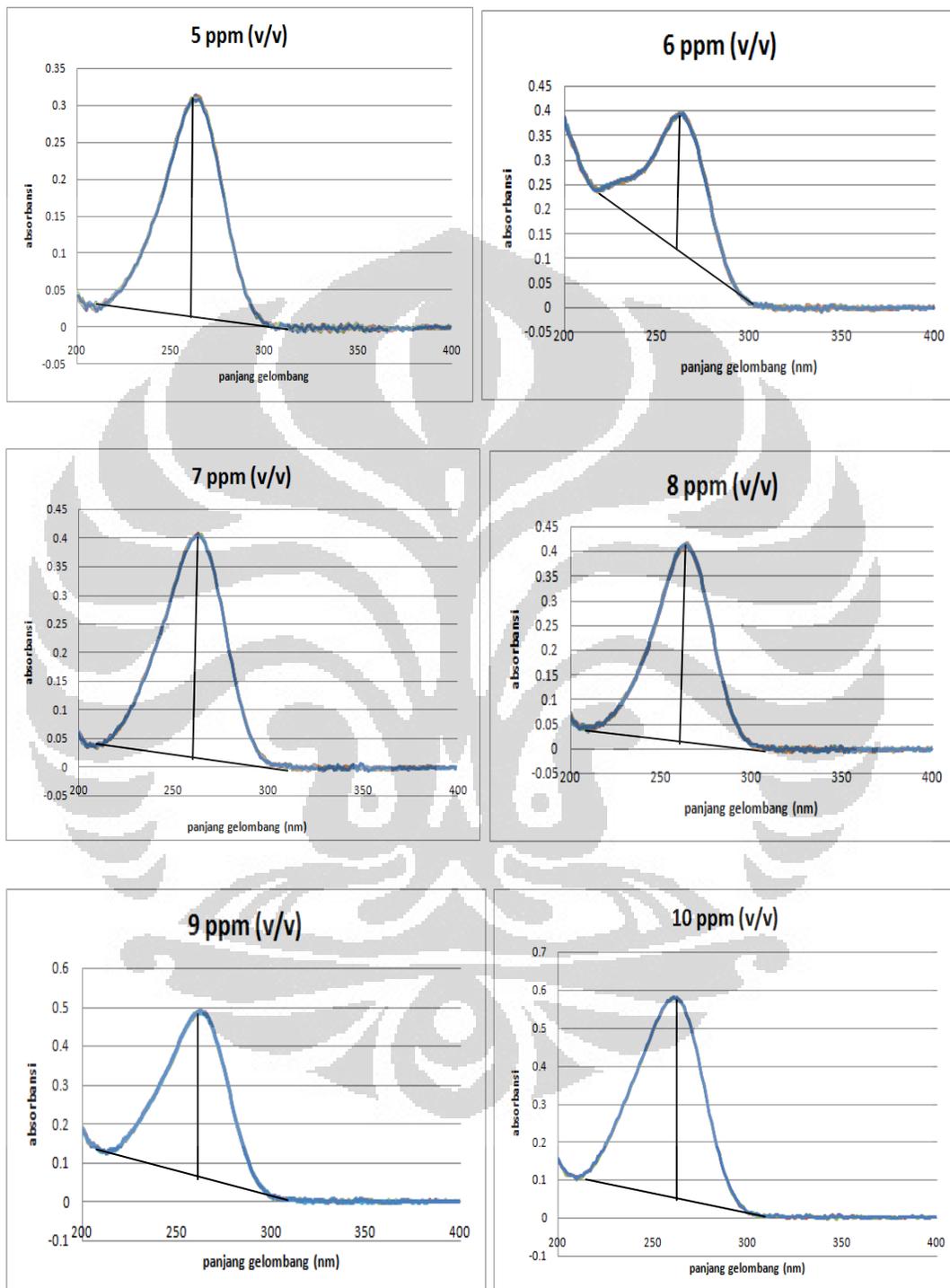


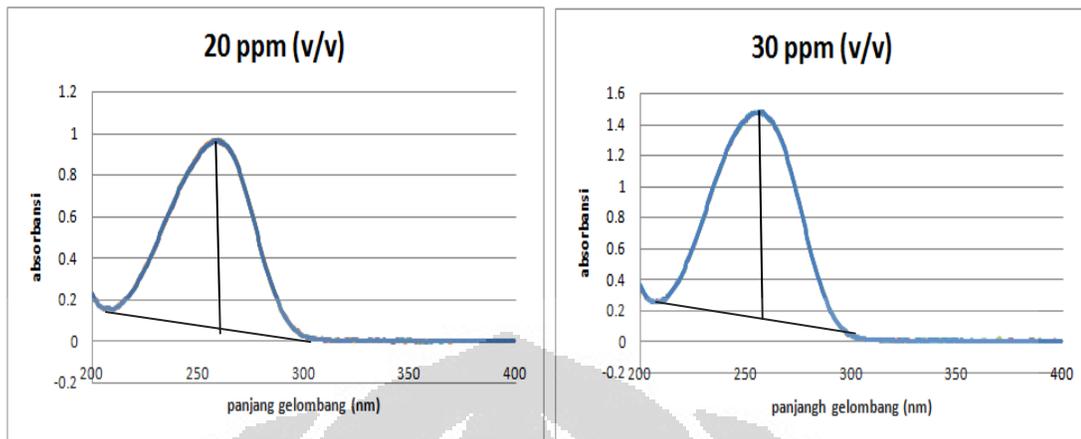
Lampiran 1

A. Uji Presisi

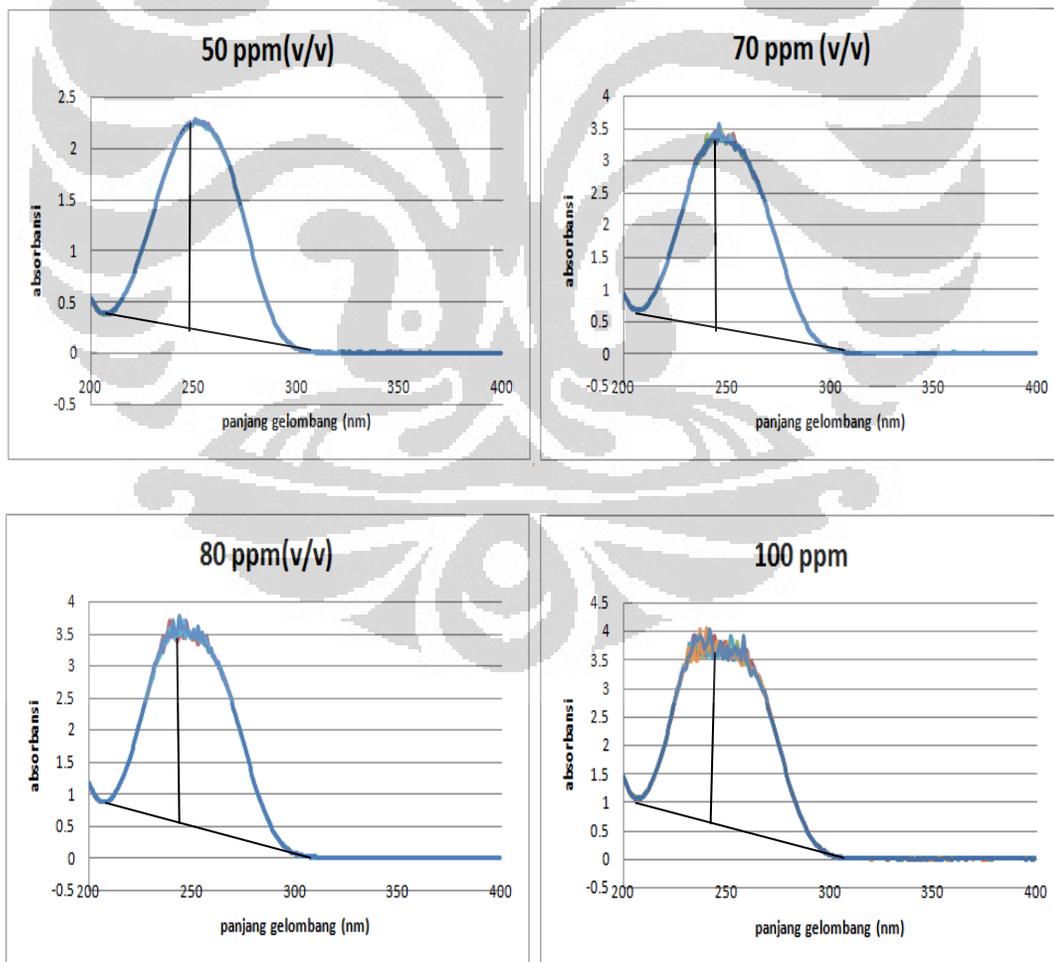
1. Kurva Uji Presisi pada panjang gelombang 265 nm (Pelarut aquabidest)







2. Kurva Uji Presisi pada panjang gelombang 243 nm (Pelarut aquabides)



3. Uji presisi asam askorbat pada panjang gelombang 265nm (Pelarut aquabidest)

I. Uji presisi asam askorbat konsentrasi 0.1 ppm (v/v)

| n | konsentrasi | absorbansi | absorbansi rata rata | SD | %RSD |
|----|----------------|-------------|----------------------|------------|----------|
| 1 | 0.1 mg/L (v/v) | 0.008 | | | |
| 2 | 0.1 mg/L (v/v) | 0.007428571 | | | |
| 3 | 0.1 mg/L (v/v) | 0.008 | | | |
| 4 | 0.1 mg/L (v/v) | 0.007 | | | |
| 5 | 0.1 mg/L (v/v) | 0.008 | | | |
| 6 | 0.1 mg/L (v/v) | 0.007428571 | | | |
| 7 | 0.1 mg/L (v/v) | 0.0085 | | | |
| 8 | 0.1 mg/L (v/v) | 0.008 | | | |
| 9 | 0.1 mg/L (v/v) | 0.008 | | | |
| 10 | 0.1 mg/L (v/v) | 0.008 | 0.007835714 | 0.00042598 | 5.436446 |

Alat spektrofotometri UV-Visibel dioperasikan pada tempat dan waktu yang sama

II. Uji presisi asam askorbat konsentrasi 0.5 ppm (v/v)

| n | konsentrasi | absorbansi | absorbansi rata rata | SD | %RSD |
|----|----------------|-------------|----------------------|------------|----------|
| 1 | 0.5 mg/L (v/v) | 0.04 | | | |
| 2 | 0.5 mg/L (v/v) | 0.041666667 | | | |
| 3 | 0.5 mg/L (v/v) | 0.04 | | | |
| 4 | 0.5 mg/L (v/v) | 0.04 | | | |
| 5 | 0.5 mg/L (v/v) | 0.041666667 | | | |
| 6 | 0.5 mg/L (v/v) | 0.04 | | | |
| 7 | 0.5 mg/L (v/v) | 0.041666667 | | | |
| 8 | 0.5 mg/L (v/v) | 0.04 | | | |
| 9 | 0.5 mg/L (v/v) | 0.041666667 | | | |
| 10 | 0.5 mg/L (v/v) | 0.04 | 0.040666667 | 0.00086066 | 2.116385 |

Alat spektrofotometri UV-Visibel dioperasikan pada tempat dan waktu yang sama

III. Uji presisi asam askorbat konsentrasi 1 ppm (v/v)

| n | konsentrasi | absorbansi | absorbansi rata rata | SD | %RSD |
|----|-------------|------------|----------------------|------------|----------|
| 1 | 1mg/L (v/v) | 0.0525 | | | |
| 2 | 1mg/L (v/v) | 0.0525 | | | |
| 3 | 1mg/L (v/v) | 0.0525 | | | |
| 4 | 1mg/L (v/v) | 0.05 | | | |
| 5 | 1mg/L (v/v) | 0.0525 | | | |
| 6 | 1mg/L (v/v) | 0.05 | | | |
| 7 | 1mg/L (v/v) | 0.0525 | | | |
| 8 | 1mg/L (v/v) | 0.05 | | | |
| 9 | 1mg/L (v/v) | 0.05 | | | |
| 10 | 1mg/L (v/v) | 0.0525 | 0.0515 | 0.00129099 | 2.506785 |

Alat spektrofotometri UV-Visibel dioperasikan pada tempat dan waktu yang sama

IV. Uji presisi asam askorbat konsentrasi 5 ppm (v/v)

| n | konsentrasi | absorbansi | absorbansi rata rata | SD | %RSD |
|----|-------------|------------|----------------------|------------|----------|
| 1 | 5 mg/L(v/v) | 0.28888889 | | | |
| 2 | 5 mg/L(v/v) | 0.3 | | | |
| 3 | 5 mg/L(v/v) | 0.3 | | | |
| 4 | 5 mg/L(v/v) | 0.28888889 | | | |
| 5 | 5 mg/L(v/v) | 0.28888889 | | | |
| 6 | 5 mg/L(v/v) | 0.28888889 | | | |
| 7 | 5 mg/L(v/v) | 0.28888889 | | | |
| 8 | 5 mg/L(v/v) | 0.3 | | | |
| 9 | 5 mg/L(v/v) | 0.28888889 | | | |
| 10 | 5 mg/L(v/v) | 0.28888889 | 0.29222222 | 0.00536718 | 1.836677 |

Alat spektrofotometri UV-Visibel dioperasikan pada tempat dan waktu yang sama

V. Uji presisi asam askorbat konsentrasi 7 ppm (v/v)

| n | konsentrasi | absorbansi | absorbansi rata rata | SD | %RSD |
|----|-------------|-------------|----------------------|----------|----------|
| 1 | 7mg/L(v/v) | 0.385714286 | | | |
| 2 | 7mg/L(v/v) | 0.385714286 | | | |
| 3 | 7mg/L(v/v) | 0.385714286 | | | |
| 4 | 7mg/L(v/v) | 0.385714286 | | | |
| 5 | 7mg/L(v/v) | 0.4 | | | |
| 6 | 7mg/L(v/v) | 0.4 | | | |
| 7 | 7mg/L(v/v) | 0.385714286 | | | |
| 8 | 7mg/L(v/v) | 0.385714286 | | | |
| 9 | 7mg/L(v/v) | 0.385714286 | | | |
| 10 | 7mg/L(v/v) | 0.385714286 | 0.388571429 | 0.006023 | 1.550136 |

Alat spektrofotometri UV-Visibel dioperasikan pada tempat dan waktu yang sama

VI. Uji presisi asam askorbat konsentrasi 10 ppm (v/v)

| n | konsentrasi | absorbansi | absorbansi rata rata | SD | %RSD |
|----|-------------|-------------|----------------------|----------|----------|
| 1 | 10mg/L(v/v) | 0.533333333 | | | |
| 2 | 10mg/L(v/v) | 0.533333333 | | | |
| 3 | 10mg/L(v/v) | 0.533333333 | | | |
| 4 | 10mg/L(v/v) | 0.533333333 | | | |
| 5 | 10mg/L(v/v) | 0.533333333 | | | |
| 6 | 10mg/L(v/v) | 0.533333333 | | | |
| 7 | 10mg/L(v/v) | 0.533333333 | | | |
| 8 | 10mg/L(v/v) | 0.544444444 | | | |
| 9 | 10mg/L(v/v) | 0.533333333 | | | |
| 10 | 10mg/L(v/v) | 0.533333333 | 0.534444444 | 0.003514 | 0.657438 |

Alat spektrofotometri UV-Visibel dioperasikan pada tempat dan waktu yang sama

4. Uji presisi asam askorbat pada panjang gelombang 243 nm (Pelarut aquabidest)

I. Uji presisi asam askorbat konsentrasi 30 ppm (v/v)

| n | konsentrasi | absorbansi | absorbansi rata rata | SD | %RSD |
|----|-------------|------------|----------------------|----------|--------|
| 1 | 30mg/L(v/v) | 1.15 | 1.115 | 0.024721 | 2.2171 |
| 2 | 30mg/L(v/v) | 1.15 | | | |
| 3 | 30mg/L(v/v) | 1.1 | | | |
| 4 | 30mg/L(v/v) | 1.1 | | | |
| 5 | 30mg/L(v/v) | 1.1 | | | |
| 6 | 30mg/L(v/v) | 1.1 | | | |
| 7 | 30mg/L(v/v) | 1.1 | | | |
| 8 | 30mg/L(v/v) | 1.1 | | | |
| 9 | 30mg/L(v/v) | 1.15 | | | |
| 10 | 30mg/L(v/v) | 1.1 | | | |

Alat spektrofotometri UV-Visibel dioperasikan pada tempat dan waktu yang sama

II. Uji presisi asam askorbat konsentrasi 50 ppm (v/v)

| n | konsentrasi | absorbansi | absorbansi rata rata | SD | %RSD |
|----|-------------|------------|----------------------|----------|----------|
| 1 | 50mg/L(v/v) | 2 | 1.95 | 0.043033 | 2.206828 |
| 2 | 50mg/L(v/v) | 2 | | | |
| 3 | 50mg/L(v/v) | 2 | | | |
| 4 | 50mg/L(v/v) | 1.916667 | | | |
| 5 | 50mg/L(v/v) | 2 | | | |
| 6 | 50mg/L(v/v) | 1.916667 | | | |
| 7 | 50mg/L(v/v) | 1.916667 | | | |
| 8 | 50mg/L(v/v) | 1.916667 | | | |
| 9 | 50mg/L(v/v) | 1.916667 | | | |
| 10 | 50mg/L(v/v) | 1.916667 | | | |

Alat spektrofotometri UV-Visibel dioperasikan pada tempat dan waktu yang sama

III. Uji presisi asam askorbat konsentrasi 70 ppm (v/v)

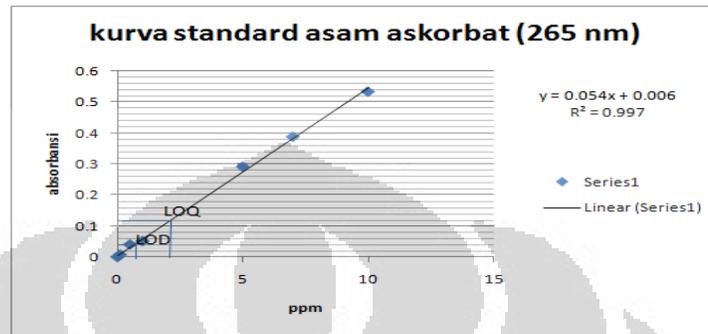
| n | konsentrasi | absorbansi | absorbansi rata rata | SD | %RSD |
|----|-------------|------------|----------------------|----------|----------|
| 1 | 70mg/L(v/v) | 2.875 | 2.9125 | 0.052705 | 1.809601 |
| 2 | 70mg/L(v/v) | 3 | | | |
| 3 | 70mg/L(v/v) | 3 | | | |
| 4 | 70mg/L(v/v) | 2.875 | | | |
| 5 | 70mg/L(v/v) | 2.875 | | | |
| 6 | 70mg/L(v/v) | 2.875 | | | |
| 7 | 70mg/L(v/v) | 2.875 | | | |
| 8 | 70mg/L(v/v) | 2.9375 | | | |
| 9 | 70mg/L(v/v) | 2.9375 | | | |
| 10 | 70mg/L(v/v) | 2.875 | | | |

Alat spektrofotometri UV-Visibel dioperasikan pada tempat dan waktu yang sama

Lampiran 2

B. Uji Linieritas asam askorbat

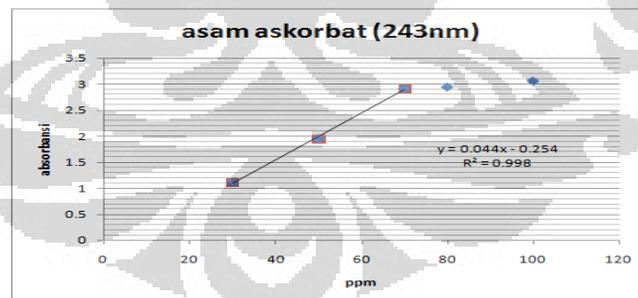
1. Kurva standar asam askorbat pada panjang gelombang 265 nm



| n | x_i | y_i | x^2 | $(x^2-x_i)^2$ | y^2 | $x_i y_i$ | \bar{y} | $(y_i - \bar{y})^2$ |
|--------|----------|----------|--------|---------------|----------|-----------|-----------|---------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 11.36653 | 0 | 0 | 0.006 | 0.000036 |
| 2 | 0.1 | 0.007836 | 0.01 | 10.70225 | 6.14E-05 | 0.000784 | 0.0114 | 1.27E-05 |
| 3 | 0.5 | 0.040667 | 0.25 | 8.245105 | 0.001654 | 0.020333 | 0.033 | 5.88E-05 |
| 4 | 1 | 0.0515 | 1 | 5.623676 | 0.002652 | 0.0515 | 0.06 | 7.22E-05 |
| 5 | 5 | 0.292222 | 25 | 2.652244 | 0.085394 | 1.461111 | 0.276 | 0.000263 |
| 6 | 7 | 0.388571 | 49 | 13.16653 | 0.150988 | 2.72 | 0.384 | 2.09E-05 |
| 7 | 10 | 0.534444 | 100 | 43.93795 | 0.285631 | 5.344444 | 0.546 | 0.000134 |
| jumlah | 23.6 | 1.31524 | 175.26 | 95.69429 | 0.52638 | 9.598172 | 1.3164 | 0.000597 |
| rata | 3.371429 | 0.187891 | | | | | | |

$S_d = 0,011$, $S_b = 0,001$, dan $S_a = 0,006$, $LoD = 0.607$, $LoQ = 2.024$

2. Kurva standar asam askorbat pada panjang gelombang 243 nm

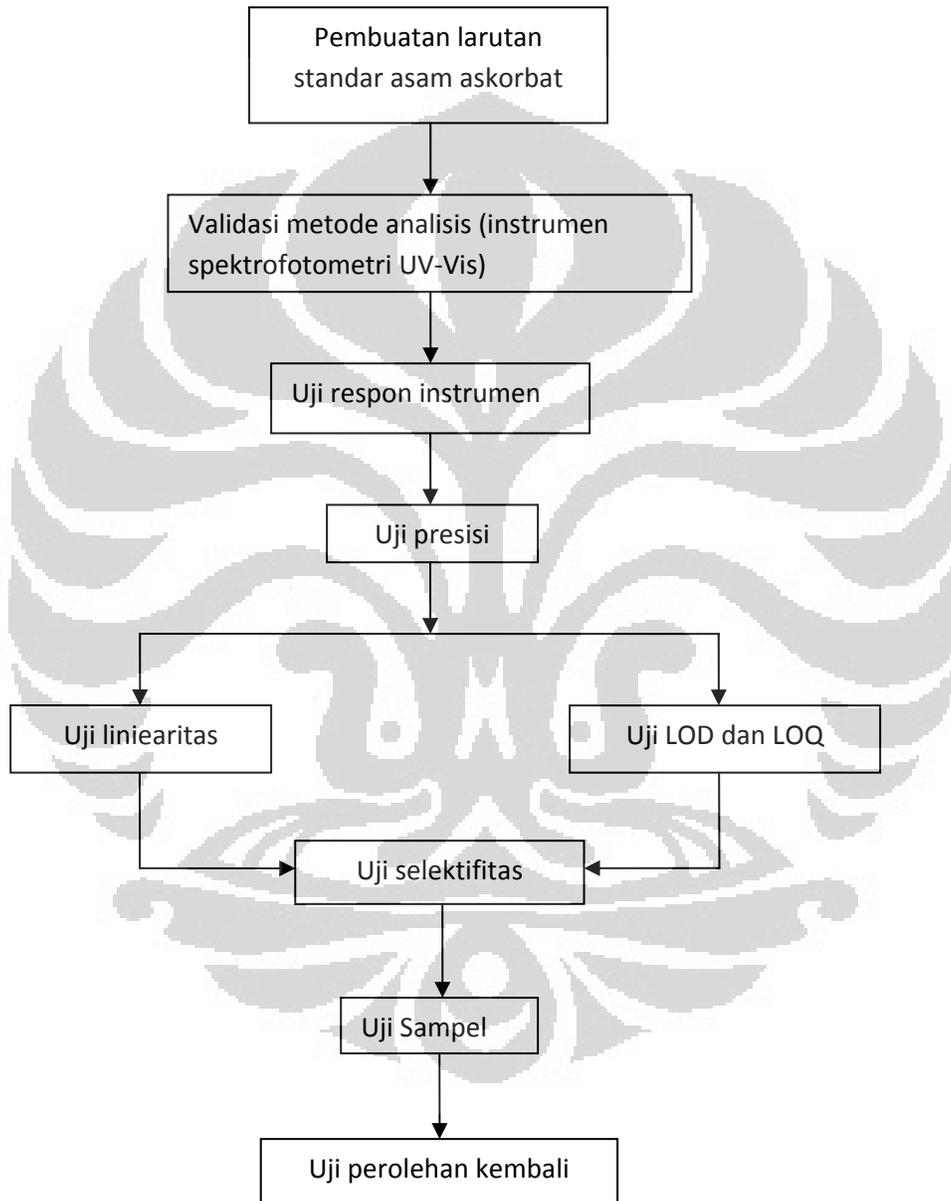


| n | x_i | y_i | x^2 | $(x^2-x_i)^2$ | y^2 | $x_i y_i$ | \bar{y} | $(y_i - \bar{y})^2$ |
|--------|-------|--------|-------|---------------|----------|-----------|-----------|---------------------|
| 1 | 30 | 1.115 | 900 | 400 | 1.243225 | 33.45 | 1.066 | 0.002401 |
| 2 | 50 | 1.95 | 2500 | 0 | 3.8025 | 97.5 | 1.946 | 1.6E-05 |
| 3 | 70 | 2.9125 | 4900 | 400 | 8.482656 | 203.875 | 2.826 | 0.007482 |
| jumlah | 150 | 5.9775 | 8300 | 800 | 13.52838 | 334.825 | 5.838 | 0.009899 |
| rata | 50 | 1.9925 | | | | | | |

$S_d = 0.099$, $S_b = 0,044 \pm 0.004$ dan $S_a = 0.185$

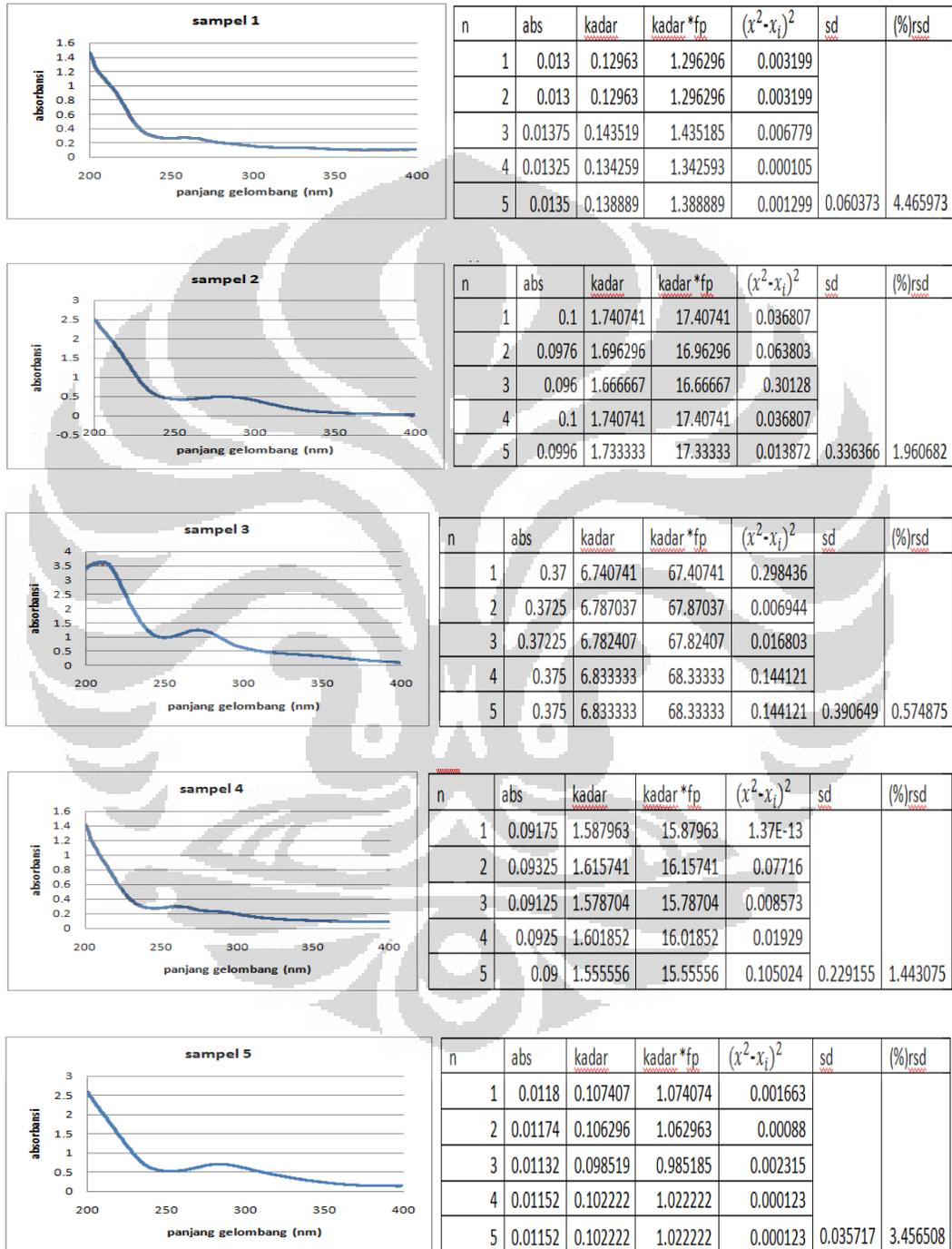
Lampiran 3

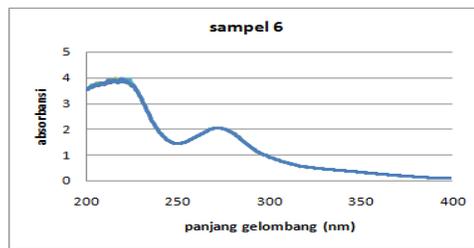
C. Bagan Kerja



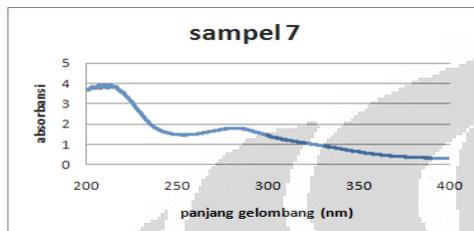
Lampran 4

D. Uji sampel

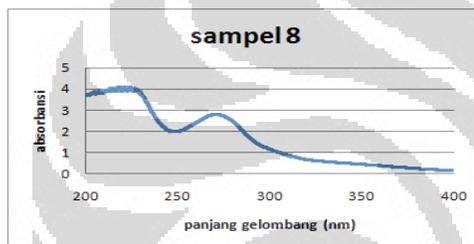




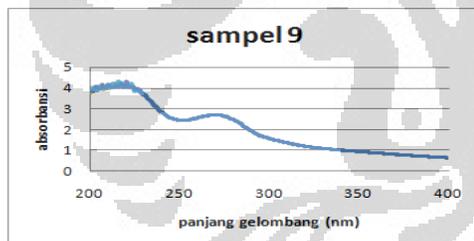
| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|---------|----------|-----------|---------------|----------|----------|
| 1 | 0.1 | 1.740741 | 17.40741 | 0.173608 | 0.414087 | 2.323188 |
| 2 | 0.105 | 1.833333 | 18.33333 | 0.259349 | | |
| 3 | 0.1025 | 1.787037 | 17.87037 | 0.002144 | | |
| 4 | 0.1 | 1.740741 | 17.40741 | 0.173608 | | |
| 5 | 0.10375 | 1.810185 | 18.10185 | 0.077163 | | |



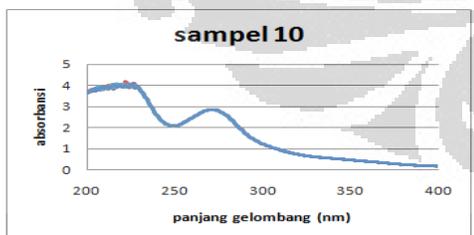
| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|----------|----------|-----------|---------------|----------|----------|
| 1 | 0.028857 | 0.42328 | 4.232804 | 0.001008 | 0.109717 | 2.572759 |
| 2 | 0.029143 | 0.428571 | 4.285714 | 0.000448 | | |
| 3 | 0.028571 | 0.417989 | 4.179894 | 0.007167 | | |
| 4 | 0.028571 | 0.417989 | 4.179894 | 0.007167 | | |
| 5 | 0.03 | 0.444444 | 4.444444 | 0.032362 | | |



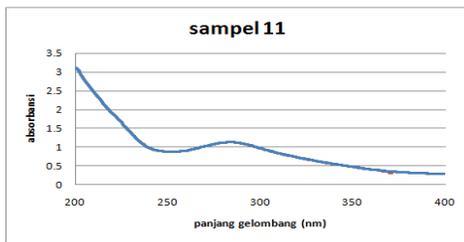
| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|----------|----------|-----------|---------------|----------|----------|
| 1 | 0.101143 | 1.761905 | 17.61905 | 0.028665 | 0.339615 | 1.946247 |
| 2 | 0.098286 | 1.708995 | 17.08995 | 0.129451 | | |
| 3 | 0.1 | 1.740741 | 17.40741 | 0.001792 | | |
| 4 | 0.102857 | 1.793651 | 17.93651 | 0.236943 | | |
| 5 | 0.098857 | 1.719577 | 17.19577 | 0.064502 | | |



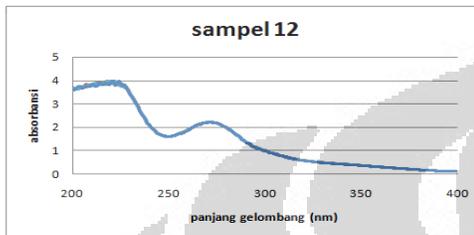
| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|----------|----------|-----------|---------------|----------|----------|
| 1 | 0.037143 | 0.57672 | 5.767196 | 0.045027 | 0.201476 | 3.626576 |
| 2 | 0.034286 | 0.52381 | 5.238095 | 0.100429 | | |
| 3 | 0.035714 | 0.550265 | 5.502646 | 0.002741 | | |
| 4 | 0.036286 | 0.560847 | 5.608466 | 0.002859 | | |
| 5 | 0.036571 | 0.566138 | 5.661376 | 0.011316 | | |



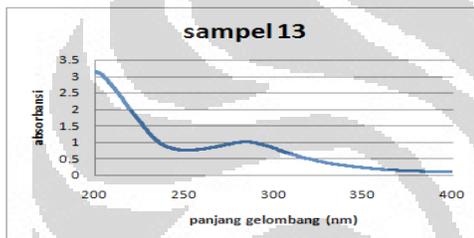
| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|----------|----------|-----------|---------------|---------|----------|
| 1 | 0.250875 | 4.534722 | 45.34722 | 8.57E-05 | 0.00732 | 0.016139 |
| 2 | 0.2509 | 4.535185 | 45.35185 | 2.14E-05 | | |
| 3 | 0.250925 | 4.535648 | 45.35648 | 2.19E-12 | | |
| 4 | 0.250975 | 4.536574 | 45.36574 | 8.58E-05 | | |
| 5 | 0.25095 | 4.536111 | 45.36111 | 2.14E-05 | | |



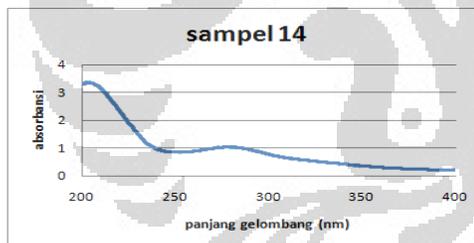
| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|---------|----------|-----------|---------------|----------|----------|
| 1 | 0.25 | 4.518519 | 45.18519 | 0.03095 | 0.174458 | 0.387604 |
| 2 | 0.249 | 4.5 | 45 | 8.57E-05 | | |
| 3 | 0.2495 | 4.509259 | 45.09259 | 0.006944 | | |
| 4 | 0.24925 | 4.50463 | 45.0463 | 0.001372 | | |
| 5 | 0.2475 | 4.472222 | 44.72222 | 0.082391 | | |



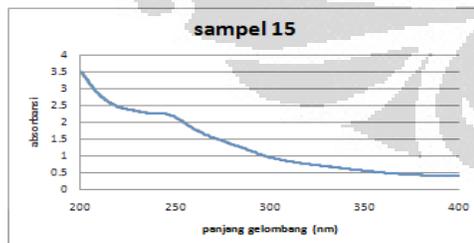
| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|----------|----------|-----------|---------------|----------|---------|
| 1 | 0.255875 | 4.627315 | 46.27315 | 0.00319 | 0.057676 | 0.12449 |
| 2 | 0.256125 | 4.631944 | 46.31944 | 0.000104 | | |
| 3 | 0.256625 | 4.641204 | 46.41204 | 0.006791 | | |
| 4 | 0.25635 | 4.636111 | 46.36111 | 0.000991 | | |
| 5 | 0.255925 | 4.628241 | 46.28241 | 0.00223 | | |



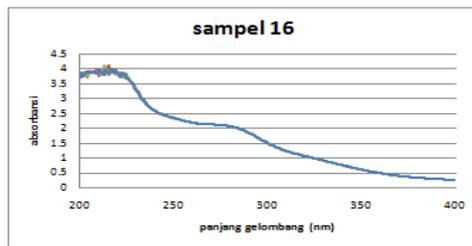
| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|--------|----------|-----------|---------------|---------|----------|
| 1 | 0.1375 | 2.435185 | 24.35185 | 1.038059 | 0.60363 | 2.586986 |
| 2 | 0.13 | 2.296296 | 22.96296 | 0.136927 | | |
| 3 | 0.1325 | 2.342593 | 23.42593 | 0.008635 | | |
| 4 | 0.13 | 2.296296 | 22.96296 | 0.136927 | | |
| 5 | 0.13 | 2.296296 | 22.96296 | 0.136927 | | |



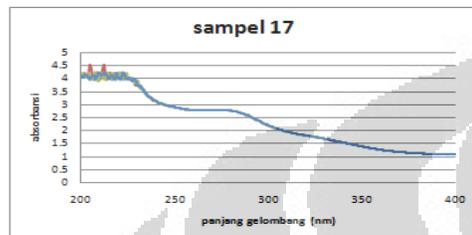
| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|----------|----------|-----------|---------------|----------|----------|
| 1 | 0.2275 | 4.101852 | 41.01852 | 0.009452 | 0.204701 | 0.497865 |
| 2 | 0.227625 | 4.104167 | 41.04167 | 0.005487 | | |
| 3 | 0.2275 | 4.101852 | 41.01852 | 0.009452 | | |
| 4 | 0.23 | 4.148148 | 41.48148 | 0.133767 | | |
| 5 | 0.2275 | 4.101852 | 41.01852 | 0.009452 | | |



| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|----------|----------|-----------|---------------|---------|----------|
| 1 | 0.0215 | 0.287037 | 2.87037 | 3.09E-05 | 0.03607 | 1.254189 |
| 2 | 0.02125 | 0.282407 | 2.824074 | 0.002689 | | |
| 3 | 0.021475 | 0.286574 | 2.865741 | 0.000104 | | |
| 4 | 0.021675 | 0.290278 | 2.902778 | 0.000721 | | |
| 5 | 0.02175 | 0.291667 | 2.916667 | 0.00166 | | |



| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|---------|----------|-----------|---------------|----------|----------|
| 1 | 0.19025 | 3.412037 | 34.12037 | 0.006944 | 0.816707 | 2.387772 |
| 2 | 0.195 | 3.5 | 35 | 0.634094 | | |
| 3 | 0.18525 | 3.319444 | 33.19444 | 1.018597 | | |
| 4 | 0.18775 | 3.365741 | 33.65741 | 0.298436 | | |
| 5 | 0.19525 | 3.50463 | 35.0463 | 0.709969 | | |



| n | abs | kadar | kadar *fp | $(x^2-x_i)^2$ | sd | (%)rsd |
|---|----------|----------|-----------|---------------|----------|----------|
| 1 | 0.1525 | 2.712963 | 27.12963 | 0.537773 | 0.551729 | 1.980151 |
| 2 | 0.15525 | 2.763889 | 27.63889 | 0.050208 | | |
| 3 | 0.16 | 2.851852 | 28.51852 | 0.429757 | | |
| 4 | 0.155775 | 2.773611 | 27.73611 | 0.016091 | | |
| 5 | 0.158775 | 2.829167 | 28.29167 | 0.183789 | | |

| sampel | kadar (ppm) | kadar *fp (ppm) | sd | % rsd |
|--------|---------------------------------|-----------------|-------|-------|
| 1 | dibawah limit deteksi | | | |
| 2 | 1.716 | 17.156 | 0.336 | 1.961 |
| 3 | 6.795 | 67.954 | 0.391 | 0.575 |
| 4 | 1.588 | 15.880 | 0.229 | 1.443 |
| 5 | dibawah limit deteksi 0.607 ppm | | | |
| 6 | 1.782 | 17.824 | 0.414 | 2.323 |
| 7 | dibawah limit deteksi 0.607 ppm | | | |
| 8 | 1.745 | 17.450 | 0.340 | 1.946 |
| 9 | dibawah limit deteksi 0.607 ppm | | | |
| 10 | 4.536 | 45.356 | 0.007 | 0.016 |
| 11 | 4.501 | 45.009 | 0.174 | 0.388 |
| 12 | 4.633 | 46.330 | 0.058 | 0.124 |
| 13 | 2.333 | 23.333 | 0.604 | 2.587 |
| 14 | 4.112 | 41.116 | 0.205 | 0.498 |
| 15 | dibawah limit deteksi 0.607 ppm | | | |
| 16 | 3.420 | 34.204 | 0.817 | 2.388 |
| 17 | 6.795 | 6.795 | 0.552 | 1.980 |