



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGEMBANGAN METODA PENGUJIAN KANDUNGAN
VITAMIN B₁, B₂, B₉ SECARA SIMULTAN
DALAM TEPUNG TERIGU
MENGUNAKAN LC-MS/MS**

TESIS

**ADISAM. ZN
0906495261**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA**

DEPOK

JULI 2012

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : ADISAM.ZN

NPM : 0906495261

Tanda Tangan





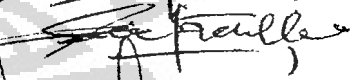

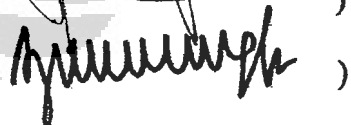
Tanggal : 12 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : ADISAM.ZN
NPM : 0906.495.261
Program Studi : Kimia
Judul Tesis : Pengembangan Metoda Pengujian Kandungan Vitamin B₁, B₂, B₉ secara simultan dalam Tepung Terigu menggunakan LC-MS-MS.

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Jarnuzi Gunlazuardi ()
Penguji : Prof. Dr. Endang Asijati, W.M.Sc ()
Penguji : Dr. Asep Saefumillah, M.Si ()
Penguji : Dr. Endang Saepudin ()
Penguji : Dr. Agustino Zulys, MSc ()

Ditetapkan di : DEPOK
Tanggal : 12 JULI 2012

Kata Pengantar

Alhamdulillah kami panjatkan kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan karunia dan rahmatnya, sehingga dapat menyelesaikan amanah tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Master Sains Jurusan Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Kami menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa kuliah sampai pada penyusunan tesis ini, sangat sulit bagi kami untuk menyelesaikan tesis ini.

Oleh karena itu, kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

- (1) Dr. Jarnuzi Gunlazuardi, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan dalam penyusunan tesis ini.
- (2) Prof. Dr. Endang Asijati, W. MSc, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan dalam penyusunan tesis ini.
- (3) Dr. Endang Saefudin, selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Kimia, Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia.
- (4) Dr. Asep Saefumillah, M.Si, selaku sekretaris Program Studi Magister Ilmu Kimia, Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia.
- (5) H. Muhaimin widodo, selaku Kepala Laboratorium Unit Cibitung, PT. Sucofindo.
- (6) Ns, Imelda Pujiharti, S.Kep, istriku yang telah dengan setia memberikan dukungan dengan cinta kasih dalam menyelesaikan studi pasca-sarjana dan penyusunan tesis ini.

- (7) Ibunda tercinta Nursema, Ananda Daffa, Rasya dan Ryzky yang telah memberikan bantuan doa, dan dukungan dengan penuh keikhlasan dan cinta kasih
- (8) Sahabat-sahabat mahasiswa S2, angkatan 2009, karyawan laboratorium PT. Sucofindo dan Loka Kelautan Anyer yang telah mendukung dengan doa dan semangat pada penulis.

Seluruh dosen dan karyawan jurusan Kimia FMIPA-UI, yang telah memberikan bantuan dan dorongan semangat pada penulis, serta semua pihak yang telah memberikan bantuan selama penulisan dan penyusunan tesis ini.

Akhir kata, kami berdoa semoga Allah SWT memberikan pahala dan kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan Ilmu Pengetahuan.

**Penulis
2012**

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

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

Nama : Adisam.ZN
NPM : 0906.495.261
Program Studi : Kimia Non Hayati
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Tesis

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

**PENGEMBANGAN METODA PENGUJIAN KANDUNGAN
VITAMIN B₁, B₂, B₉ SECARA SIMULTAN DALAM TEPUNG
TERIGU MENGGUNAKAN LC-MS/MS**

Dengan hak bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihkannmeria/formatkan dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/penciptadan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Depok, 12 Juli 2012
Yang menyatakan



(Adisam.ZN)

ABSTRAK

Nama : Adisam.ZN
Program studi : Ilmu Kimia
Judul : Pengembangan Metoda pengujian kandungan vitamin B₁, B₂, B₉ secara simultan dalam tepung terigu menggunakan LC-MS/MS.

Dalam rangka mengukur kandungan vitamin B₁, B₂ dan B₉ secara simultan dalam tepung terigu yang difortifikasi telah dikembangkan metoda yang cepat, selektif, akurat menggunakan kromatografi cair tandem triple quadrupole spektrometri massa (LC-MS/MS). Analisis dilakukan menggunakan tehnik *ionisasi elektropray* (ESI) positive mode dan detektor MS-MS menggunakan *multi reaction monitoring* (MRM) mode. Ion prekursor dan ion produk pada m/z 265 → 144 untuk vitamin B₁, 377 → 243 untuk vitamin B₂, dan 442 → 295 untuk vitamin B₉ digunakan untuk identifikasi dan karakterisasi.

Kinerja metoda yang dievaluasi adalah selektifitas, linearitas, rentang, akurasi, limit deteksi, limit kuantitasi. Hasil analisis statistik menunjukkan selektifitas yang baik, koefisien korelasi (r^2) untuk vitamin B₁, B₂, B₉ adalah 0,9986, 0,9999, 0,9988 dengan rentang konsentrasi 0,1 – 200 ppb, limit deteksi (LOD) 3,10 (B₁), 4,60 (B₂), 7,0 (B₉), µg/L, limit kuantitasi (LOQ) 10,0 (B₁), 15,0 (B₂), 23,0 (B₉), µg/L dan akurasi 90,89 % (B₁), 78,11 % (B₂), 64,01 % (B₉).

Kata Kunci : LC MS/MS. ESI, MRM
xix, 101 halaman : 45 gambar, 11 tabel
Daftar Pustaka : 49 (1993 – 2011)

ABSTRACT

Name : Adisam.ZN
Program study : Chemistry
Judul : A Developed methods to Quantify vitamins B₁, B₂, B₉ in Wheat Flours simoultansly using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

In order to monitor the fortification level of vitamins B₁, B₂ dan B₉ in wheat flours simoultansly, developed a selective, fast and accurate methods using the liquid Chromatography with tandem triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) technique. The analysis was performed using electrospray ionization (ESI) tehniqe with positive mode and the instrument was set in MRM (Multiple Reaction Monitoring) . Ion precursor and product was identified and characterized at m/z 265 → 144 for vitamin B₁, 377 → 243 for vitamin B₂, dan 442 → 295 for vitamin B₉.

The methods performance was evaluated in regard to selectivity, linearity, range, accuracy, limit of detection, limit of quantitation. The statistical analysis of the result showed good selectivity, correlation coefficient (r^2) 0.9986, 0.9999, 0.9988 vitamins B₁, B₂, B₉ respectively, with the concentration range 0,1 – 200 µg/L, limit of detection (LOD) 3,10 (B₁), 4,60 (B₂), 7,0 (B₉), µg/L, limit of quantitaion (LOQ) 10,0 (B₁), 15,0 (B₂), 23,0 (B₉), µg/L and accuracy 90,89 % (B₁), 78,11 % (B₂), 64,01 % (B₉).

Key word : LC MS/MS. ESI, MRM
xix, 101 pages : 45 pictures, 11 tables
Bibliography : 49 (1993 – 2011)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Hipotesis.....	4
1.5. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Fortifikasi Tepung Terigu.....	5
2.2. Vitamin B ₁	6
2.3. Vitamin B ₂	8
2.4. Vitamin B ₉	10
2.5. LC-MS/MS.....	12
2.6. Unjuk kerja metoda uji.....	20
BAB III. METODE PENELITIAN.....	22
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
3.2. Bahan dan alat.....	22
3.2.1. Bahan.....	22
3.2.2. Peralatan.....	22
3.3. Prosedur Penelitian.....	23

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1. Identifikasi ion prekursor vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉ dengan alat LC-MS/MS merk agilent.....	27
4.2. Identifikasi ion produk vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	31
4.3. Optimasi energi <i>collision</i> ion prekursor vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	35
4.4. Optimasi energi pembentukan ion produk vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	37
4.5. Optimasi kondisi ionisasi masing-masing vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	39
4.5.1. Optimasi <i>nebulizer</i> untuk ionisasi vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉ ...	40
4.5.2. Optimasi laju alir gas untuk ionisasi vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	41
4.5.3. Optimasi temperatur gas ionisasi vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	42
4.5.4. Kondisi Optimasi campuran ionisasi vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	43
4.6. Identifikasi ion prekursor dan ion produk dengan alat waters aquity TQD.....	43
4.6.1. Identifikasi ion prekursor dan ion produk vitamin B ₁	44
4.6.2. Identifikasi ion prekursor dan ion produk vitamin B ₂	46
4.6.3. Identifikasi ion prekursor dan ion produk vitamin B ₉	48
4.7. Profil Kromatogram	49
4.7.1. Profil kromatogram menggunakan alat merek agilent dengan kolom agilent zorbat RRHT SB-Aq.....	50
4.7.2. Profil kromatogram menggunakan alat waters dengan kolom waters aquity C8.....	51
4.7.3. Profil kromatogram menggunakan alat waters dan kolom waters aquity C18.....	52
4.7.4. Optimasi kondisi fase gerak menggunakan alat waters dengan kolom waters aquity C18	53

4.8.	Penentuan Kinerja metoda uji.....	55
4.8.1	Penentuan Linearitas dan Rentang Ukur menggunakan alat waters dan agilent.....	55
4.8.2	Penentuan batas deteksi.....	56
4.8.3	Penentuan ketepatan metoda (akurasi).....	59
4.9.	Pengukuran sampel.....	59
4.10.	Pemisahan menggunakan alat agilent dan kolom waters acquity HSS T3.....	61
4.10.1.	Penentuan Linearitas dan rentang ukur menggunakan alat agilent dan kolom waters acquity HSS T3.....	63
4.10.2.	Penentuan Limit Deteksi menggunakan alat agilent dan kolom waters acquity HSS T3.....	65
4.10.3.	Penentuan ketepatan akurasi menggunakan alat agilent dan kolom waters acquity HSS T3.....	65
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....		67
5.1.	Kesimpulan.....	67
5.2.	Saran.....	68
DAFTAR PUSTAKA.....		69
LAMPIRAN.....		73

DAFTAR GAMBAR

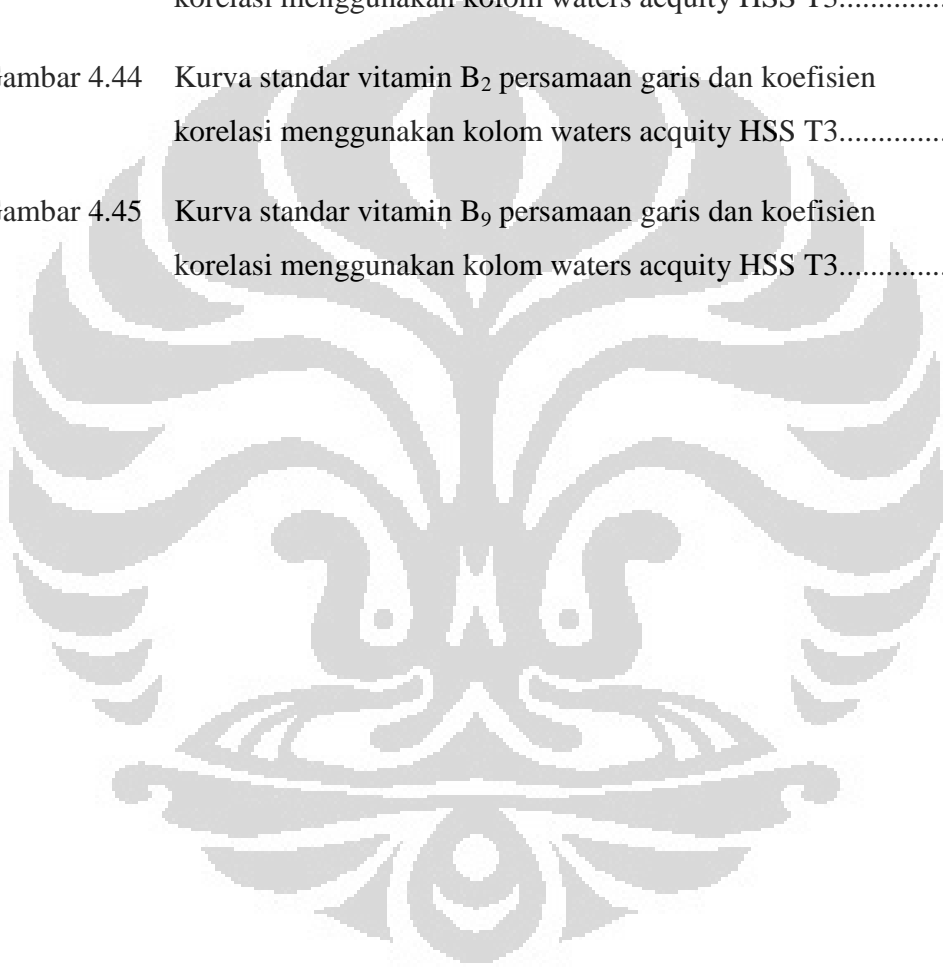
Gambar 2.1	Struktur Tiamin.....	7
Gambar 2.2	Struktur Riboflavin.....	8
Gambar 2.3	Struktur Asam folat.....	10
Gambar 2.4	Skema LC-MS/MS.....	12
Gambar 2.5	ilustrasi perkembangan ukuran partikel kolom dengan nilai HETP.....	14
Gambar 2.6	Aplikasi teknik ionisasi APCI, APPI, ESI terhadap kepolaran....	15
Gambar 2.7	Skema ionisasi elektropray.....	15
Gambar 2.8	Proses ionisasi elektroparay.....	16
Gambar 2.9	Skema Triple Quadrupole.....	17
Gambar 2.10	Proses Eksperimen dalam LC-MS/MS.....	18
Gambar 4.1	Spektogram massa ion (TIC) standar vitamin B ₁	28
Gambar 4.2	Spektogram massa ion (TIC) standar vitamin B ₂	28
Gambar 4.3	Spektogram massa ion (TIC) standar vitamin B ₉	29
Gambar 4.4	Proses ionisasi vitamin B ₁	29
Gambar 4.5	Proses ionisasi vitamin B ₂	30
Gambar 4.6	Proses ionisasi vitamin B ₉	30
Gambar 4.7	Spektogram massa fragmentasi vitamin B ₁	32

Gambar 4.8	Proses fragmentasi vitamin B ₁	32
Gambar 4.9	Spektogram massa fragmentasi vitamin B ₂	33
Gambar 4.10	Proses fragmentasi vitamin B ₂	34
Gambar 4.11	Spektogram massa fragmentasi vitamin B ₉	34
Gambar 4.12	Proses fragmentasi vitamin B ₉	35
Gambar 4.13	Grafik energi CID vs relatif respon ion prekursor vit B ₁ m/z 265.....	36
Gambar 4.14	Grafik energi CID vs relatif respon ion prekursor vit B ₂ m/z 377.....	36
Gambar 4.15	Grafik energi CID vs relatif respon ion prekursor vit B ₉ m/z 442.....	37
Gambar 4.16	Grafik energi CID vs relatif respon ion produk vit B ₁ m/z 122.	38
Gambar 4.17	Grafik energi CID vs relatif respon ion produk vit B ₂ m/z 243.	38
Gambar 4.18	Grafik energi CID vs relatif respon ion produk vit B ₉ m/z 295.	38
Gambar 4.19	Grafik tekanan nebulizer vs relatif respon ion prekursor vit B ₁ ...	40
Gambar 4.20	Grafik tekanan nebulizer vs relatif respon ion prekursor vit B ₂ ...	40
Gambar 4.21	Grafik tekanan nebulizer vs relatif respon ion prekursor vit B ₉ ...	41

Gambar 4.22	Grafik laju alir vs relative respon ion prekursor vit B ₁	41
Gambar 4.23	Grafik laju alir vs relative respon ion prekursor vit B ₂	42
Gambar 4.24	Grafik laju alir vs relative respon ion prekursor vit B ₉	42
Gambar 4.25	Spektogram massa, struktur molekul ion prekursor (a) dan ion produk (b) vitamin B ₁	45
Gambar 4.26	Spektogram massa, struktur molekul ion prekursor (a) dan ion produk (b) vitamin B ₂	47
Gambar 4.27	Spektogram massa, struktur molekul ion prekursor (a) dan ion produk (b) vitamin B ₉	48
Gambar 4.28	Kromatogram standar vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉ dengan alat agilent.....	51
Gambar 4.29	Kromatogram standar vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉ dengan alat waters dan kolom aquity C8.....	51
Gambar 4.30	Kromatogram standar vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉ dengan alat waters dan kolom aquity C18.....	52
Gambar 4.31	Kromatogram standar vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉ dengan komposisi fase gerak 30 :70 dengan kolom aquity C ₁₈	53
Gambar 4.32	Kromatogram standar vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉ dengan komposisi fase gerak 50:50 dengan kolom C ₁₈	54

Gambar 4.33	Kromatogram standar vitamin B ₁ ,B ₂ B ₉ dengan komposisi fase gerak 60:40 dengan kolom C ₁₈	54
Gambar 4.34	Persamaan regresi, nilai r ² dan puncak kromatogram masing-masing standar vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	56
Gambar 4.35	Kromatogram standar terkecil vitamin B ₁ ,B ₂ , B ₉ menggunakan alat waters.....	58
Gambar 4.36	Kromatogram standar vitamin B ₁ ,B ₂ , B ₉	60
Gambar 4.37	Kromatogram sampel vitamin B ₁ ,B ₂ , B ₉	60
Gambar 4.38	Kromatogram standar vitamin B ₁ ,B ₂ , B ₉ dengan fase gerak (Air : Metanol)/70 : 30) mengandung 20 mM Ammonium Format dan 0,1 % asam format.....	61
Gambar 4.39	Kromatogram standar vitamin B ₁ ,B ₂ , B ₉ dengan fase gerak (Air : Metanol)/80 : 20) mengandung 20 mM Ammonium Format dan 0,1 % asam format.....	61
Gambar 4.40	Kromatogram standar vitamin B ₁ ,B ₂ , B ₉ dengan fase gerak (Air : Metanol)/90 : 10) mengandung 20 mM Ammonium Format dan 0,1 % asam format.....	62
Gambar 4.41	Kromatogram standar vitamin B ₁ ,B ₂ , B ₉ dengan fase gerak (Air : Metanol)/95 : 5) mengandung 20 mM Ammonium Format dan 0,1 % asam format.....	62

Gambar 4.42	Kromatogram standar vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉ dengan fase gerak (Air : Metanol)/70 : 30) mengandung 20 mM Ammonium Format dan 0,1 % asam format.....	62
Gambar 4.43	Kurva standar vitamin B ₁ persamaan garis dan koefisien korelasi menggunakan kolom waters acquity HSS T3.....	63
Gambar 4.44	Kurva standar vitamin B ₂ persamaan garis dan koefisien korelasi menggunakan kolom waters acquity HSS T3.....	64
Gambar 4.45	Kurva standar vitamin B ₉ persamaan garis dan koefisien korelasi menggunakan kolom waters acquity HSS T3.....	64



DAFTAR TABEL

TABEL 4.1	Rumus molekul, berat molekul, dan ion prekursor vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	31
TABEL 4.2	Ion prekursor dan ion produk vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	35
TABEL 4.3	Energi CID optimal ion prekursor vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	37
TABEL 4.4	Energi CID optimal ion produk vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	39
TABEL 4.5	Identifikasi dan kondisi optimal, fragmentasi vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉ .	43
TABEL 4.6	Kondisi elusi fase gerak menggunakan alat agilent.....	50
TABEL 4.7	Nilai LOD dan LOQ menggunakan perhitungan kurva standar alat waters.....	57
TABEL 4.8	Hasil pengukuran, nilai acuan dan akurasi vitamin B ₁	59
TABEL 4.9	Rentang Ukur masing-masing vitamin menggunakan kolom waters acquity HSS T3.....	65
TABEL 4.10	Nilai LOD dan LOQ masing-masing vitamin menggunakan kolom waters acquity HSS T3.....	65
TABEL 4.11	Nilai Rekoverti masing-masing vitamin menggunakan kolom waters acquity HSS T3.....	66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Spektogram massa optimasi ion prekursor vitamin B ₁	73
Lampiran 2.	Spektogram massa optimasi ion prekursor vitamin B ₂	74
Lampiran 3.	Spektogram massa optimasi ion prekursor vitamin B ₉	75
Lampiran 4.	Spektogram massa optimasi energi pembentukan ion produk vitamin B ₁	76
Lampiran 5.	Spektogram massa optimasi energi pembentukan ion produk vitamin B ₂	77
Lampiran 6.	Spektogram massa optimasi energi pembentukan ion produk vitamin B ₉	78
Lampiran 7.	Spektogram massa optimasi nebulizer untuk vitamin B ₁	79
Lampiran 8.	Spektogram massa optimasi nebulizer untuk vitamin B ₂	80
Lampiran 9.	Spektogram massa optimasi nebulizer untuk vitamin B ₉	81
Lampiran 10.	Spektogram massa optimasi laju alir gas ionisasi vitamin B ₁	82
Lampiran 11.	Spektogram massa optimasi laju alir gas ionisasi vitamin B ₂	83
Lampiran 12.	Spektogram massa optimasi laju alir gas ionisasi vitamin B ₉	84
Lampiran 13.	Spektogram massa optimasi temperatur vitamin B ₁ , B ₂ , B ₉	85
Lampiran 14.	Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B ₁ serta kromatogram standar dengan alat merk waters.....	86

Lampiran 15.	Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B ₂ serta kromatogram standar dengan alat merk waters.....	87
Lampiran 16.	Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B ₉ serta kromatogram standar .alat merk waters	88
Lampiran 17.	Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B ₁ alat merk agilent	89
Lampiran 18.	Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B ₂ dengan alat merk agilent	90
Lampiran 19.	Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B ₉ dengan alat merk agilent	91
Lampiran 20.	Kromatogram deret kurva standar alat agilent.....	92
Lampiran 21.	Perhitungan LOD dan LOQ berdasarkan kurva standar dengan alat merk agilent untuk vitamin B1 dan B2.....	94
Lampiran 22.	Perhitungan LOD dan LOQ berdasarkan kurva standar dengan alat merk agilent untuk vitamin B9.....	95
Lampiran 23.	Contoh kromatogram sampel menggunakan alat merk agilent dengan kolom zorbax.....	96
Lampiran 24.	Hasil Pengujian sampel (satuan ppm).....	98

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Dalam rangka meningkatkan gizi masyarakat dan mengurangi jumlah penduduk yang kekurangan nutrisi maka pemerintah Republik Indonesia melalui kementerian kesehatan dan kementerian perindustrian bekerja-sama dengan Bank Pembangunan Asia (ADB), menetapkan kebijakan agar dilakukan fortifikasi kandungan nutrient pada pangan tertentu. Tepung terigu dipilih karena merupakan bahan pangan yang umum digunakan oleh sebagian masyarakat untuk pembuatan kue, mie, dan panganan jadi lainnya. Penetapan aturan fortifikasi dilakukan melalui surat keputusan menteri kesehatan No.962/Menkes/SK/VII/2003 yang menetapkan bahwa setiap tepung terigu yang diproduksi dalam negeri maupun import harus mempunyai kandungan fortifikasi vitamin B₁ (min 2,5 ppm), B₂ (min 4 ppm), asam folat (min 2 ppm), Besi (min 60 ppm), Seng (min 30 ppm) (Asosiasi Produsen Tepung Terigu Indonesia, 2010).

Kementerian Perindustrian melalui Surat Keputusan Menteri Perindustrian No. 153/MPP/Kep/5/2001 menetapkan penerapan SNI wajib untuk produk Tepung terigu sebagai bahan makanan, dengan nomor SNI yang termutakhir adalah SNI 3751 2009. Untuk memastikan bahwa kandungan nutrisi dalam bahan pangan sesuai dengan persyaratan standar dilakukan pemantauan dan pengujian oleh laboratorium. (Badan Standardisasi Nasional, 2008)

Dalam pelaksanaan pengujian diperlukan metoda uji yang valid untuk memantau kandungan fortifikasi yang diberikan dalam tepung terigu agar sesuai dengan persyaratan yang ditetapkan. Metoda uji yang ditetapkan menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) No. 3751 2009 untuk penentuan vitamin B₁, B₂ adalah menggunakan alat Kromatografi cair Kinerja Tinggi (KCKT) detektor UV-Vis dan vitamin B₉ menggunakan spektrofotometer dengan teknik preparasi mikrobiologi. (Badan Standardisasi Nasional, 2008). Menurut *manual of methods for determining micronutrient in fortified foods* metoda uji yang digunakan untuk

penentuan vitamin B₁, dan B₂ adalah menggunakan alat kromatografi cairan kinerja tinggi (KCKT) dengan preparasi menggunakan hidrolisa enzim dan detektor fluoresensi. Vitamin B₁ dan B₂ ditentukan secara terpisah karena menggunakan enzim yang berbeda. Metoda uji ini melalui tahapan yang cukup rumit yaitu hidrolisa menggunakan asam klorida pada pH 4,5 dan dilanjutkan dengan hidrolisa enzim kemudian dipisahkan dengan kolom kromatografi dan dideteksi menggunakan detektor Ultra violet. (Boen, T.R, dkk 2008) Metoda ini mempunyai sensitifitas yang cukup besar, noise yang tinggi, dan belum tersedia parameter kerjanya.

Penentuan vitamin B₉ menurut SNI 3751 2009 dan *manual of methods for determining micronutrient* adalah menggunakan teknik mikrobiologi dimana konsentrasi vitamin B₉ diukur secara tidak langsung melalui pertumbuhan mikroba dengan spektrofotometer. (Rylich, Michael, 2011)

Metoda uji untuk vitamin B₁, B₂, B₉, diatas mempunyai beberapa kesulitan dan kendala yaitu pengukuran dan preparasi dilakukan secara terpisah sehingga memerlukan waktu, proses preparasi yang kompleks, waktu pengerjaan yang cukup lama, karena ada proses pertumbuhan mikroba yang spesifik dan memerlukan waktu serta ketrampilan khusus. Untuk itu perlu dikembangkan suatu metoda yang mampu mengukur vitamin B₁, B₂, B₉ dengan akurat, cepat dan simultan. (Martin, Julio, et.all, 2008),

Kromatografi cair kombinasi dengan spektrometri massa merupakan pilihan teknik analisis yang dapat digunakan untuk pemisahan senyawa-senyawa yang polar dan mempunyai berat molekul besar. Teknik deteksi kombinasi antara kromatografi cair dengan spektrometri massa (LC-MS/MS) merupakan suatu teknik masa depan yang mampu mengatasi kendala-kendala dalam analisis, dapat dilakukan secara simultan termasuk meminimalkan adanya efek matriks.(Shukla, Andi K, & Futrell Jean, H, 2000) LC-MS/MS dapat melakukan identifikasi senyawa vitamin B₁, B₂, B₉ secara spesifik dan selektif, simultan serta dapat meminimalkan pengaruh matriks. Tehnik ionisasi yang dipilih yaitu tehnik ionisasi elektropray dapat melakukan ionisasi terhadap analit vitamin B₁, B₂, B₉ yang bersifat polar. (Nollet, Leo M.L, 2004)

Kromatografi cair tandem spektrometri massa (LC-MS/MS) merupakan teknik pemisahan menggunakan kolom kromatografi dengan ukuran partikel yang lebih kecil (dibawah 2 μm), dapat melakukan pemisahan yang lebih efektif, mereduksi waktu injeksi, dan efek matriks. Teknik kombinasi tandem spektrometri massa adalah teknik yang paling umum dilakukan saat ini, merupakan teknik dengan presisi tinggi, sensitifitas yang kecil, tingkat resolusi tinggi serta tingkat keakuratan deteksi massa yang tinggi. (Roge, A.B, et.al 2011), Teknik LC-MS/MS mempunyai rentang ukur yang baik dengan spektrum yang luas dan mempunyai tingkat selektifitas serta spesifisitas yang baik, sehingga teknik LC-MS/MS ini dapat digunakan sebagai alternatif penentuan kandungan vitamin B₁, B₂, B₉ secara simultan dalam matriks tepung terigu. (Rylich, Michael ,2011)

Menurut ISO/IEC 17025 suatu metode pengujian harus dilakukan validasi untuk memastikan kesesuaian atau konfirmasi kelayakan teknis unjuk kerja sesuai dengan tujuan. Validasi adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan parameter tersebut memenuhi persyaratan dalam penggunaannya. (Harmita, 2004).

1.2. Perumusan masalah

Penelitian ini dilakukan atas dasar belum tersedianya cara identifikasi dan karakterisasi vitamin B₁, B₂, B₉ yang spesifik, langsung dan simultan dalam tepung terigu yang difortifikasi serta belum ada metoda uji yang dapat melakukan pengujian secara simultan tanpa melalui tahapan proses preparasi yang rumit. Metoda uji yang ditetapkan oleh Standar Nasional Indonesia No. 3751 2009 masih mempunyai kendala dan kesulitan diantaranya :

- Memerlukan waktu lama, khususnya untuk vitamin B₉, karena harus menumbuhkan media secara biologi yang sangat spesifik dan memerlukan ketrampilan khusus.
- Pengukuran dilakukan secara terpisah dimana vitamin B₁, B₂ diukur dengan alat kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan detektor Ultra Violet sementara Vitamin B₉ menggunakan spektrofotometer.

- Belum ada nilai unjuk kerja dari metoda uji yang ditetapkan oleh Standar nasional Indonesia.

Memperhatikan kendala diatas, dipilih metoda pengujian menggunakan alat LC-MS/MS dengan teknik ionisasi elektrospray dimana teknik ini dapat melakukan pengukuran analit secara simultan meskipun terdapat puncak yang berimpit, pemisahan dilakukan berdasarkan nilai m/z , mampu mengukur sampai pada tingkat sensitifitas yang lebih baik, waktu yang diperlukan lebih cepat, dapat diminimalkan adanya interference karena sistim MRM.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk :

- . Mengembangkan cara penentuan vitamin B₁, B₂, B₉ secara spesifik dan simultan menggunakan LC-MS/MS.
- . Mengembangkan metoda uji yang mampu secara simultan mendeteksi vitamin B₁, B₂, dan B₉, dalam matriks tepung terigu.
- . Menetapkan unjuk kerja metode uji seperti selektifitas, linearitas, Batas deteksi, dan Akurasi.

1.4. Hipotesis

Dengan menggunakan kromatografi cair tandem spektrometri massa (LC-MS/MS) dapat dilakukan identifikasi dan kuantifikasi secara simultan kandungan vitamin B₁, B₂, B₉ dalam matriks fortifikasi tepung terigu dan memenuhi persyaratan kaidah unjuk kerja metoda uji.

1.5. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu dalam meningkatkan kualitas hasil pengujian di Indonesia, khususnya bagi laboratorium yang melakukan pengukuran kandungan vitamin B₁, B₂, B₉ dalam tepung terigu yang difortifikasi, sehingga dapat diminimalkan hambatan dalam transaksi perdagangan dan mempercepat waktu proses penyelesaian import barang di pelabuhan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fortifikasi tepung terigu

Fortifikasi merupakan suatu pendekatan yang dilakukan pemerintah berbagai negara dengan bantuan dan koordinasi badan pangan dunia (WHO) bertujuan untuk meningkatkan kecukupan gizi masyarakat termasuk di Indonesia. Fortifikasi salah satu pendekatan untuk mengurangi jumlah penderita kekurangan nutrient, khususnya dinegara berkembang seperti Indonesia. Fortifikasi dimaksudkan untuk memastikan agar masyarakat memperoleh pasokan pangan yang mempunyai nutrisi cukup. Sebagai bagian tanggung jawab publik maka pemerintah melalui kementerian kesehatan dan perindustrian menetapkan SNI wajib bagi produk tepung terigu dan harus dilakukan fortifikasi baik produk impor maupun yang diproduksi dalam negeri.

Penerapan fortifikasi tepung terigu dimulai tahun 1995 dengan bantuan Bank Pembangunan Asia (ADB) yang bertujuan melakukan penanggulangan kekurangan gizi mikro dengan nutrien yang difortifikasi adalah zat besi (Fe), seng (Zn), vitamin B₁ (tiamine), vitamin B₂ (riboflavin), vitamin B₉ (asam folat). Kegiatan fortifikasi tepung terigu di Indonesia secara formal dimulai th 1998 melalui surat keputusan Menteri Kesehatan no. 632 yang mewajibkan fortifikasi tepung terigu baik produsen lokal maupun impor. Kementerian Perindustrian dan Badan Standardisasi Nasional melakukan Notifikasi penerapan SNI wajib tepung terigu ke WTO dengan nomor G/TBT/N/IDN/I dan tanpa penolakan dari anggota WTO, diterbitkan surat Keputusan Menteri Perindustrian dan Perdagangan no. 153 tanggal 2 Mei 2001 tentang penerapan secara wajib SNI tepung terigu sebagai bahan makanan, hingga tahun 2001 seluruh industri tepung terigu nasional mendapatkan sertifikasi SNI.

Direktorat Bea dan Cukai u.b. Direktur Teknis kepabean menerbitkan Surat Edaran no. S 672 tanggal 28 maret 2002 tentang Importasi Tepung Terigu

yang memuat kewajiban importir agar melengkapi dengan *Certificate of Analysis* (CoA). Dekade berikutnya pemerintah melalui Menteri Perindustrian menetapkan SK no 753 tentang Standardisasi dan Pengawasan SNI (SK ini sudah diperbaharui lagi th 2007 dengan nomor 14/M-DAG/PER/3/2007) serta Surat Edaran Bea dan cukai no 20 tgl 19 Juni 2003 tentang penanganan importasi pangan dalam kemasan dan penanganan barang yang bertanda SNI. Kementerian kesehatan juga melakukan revisi SK Menkes no. 962 dengan menerbitkan SK Menkes no. 632/1998 yang mengatur tentang wajib daftar no. ML dan wajib label tepung terigu. (Asosiasi Produsen Tepung Terigu (APTINDO), 2010)

Penerapan Standar Nasional Indonesia untuk produk tepung terigu memerlukan sarana dan prasarana seperti laboratorium yang dapat menerbitkan *Certificate of Analysis* (CoA), serta melakukan pemantauan kandungan fortifikasi yang beredar dimasyarakat. Untuk dapat menerbitkan CoA laboratorium memerlukan metoda uji yang cepat, akurat dan simple sehingga tidak mengganggu proses perizinan dan importasi barang di pelabuhan.

2.2. Vitamin B₁

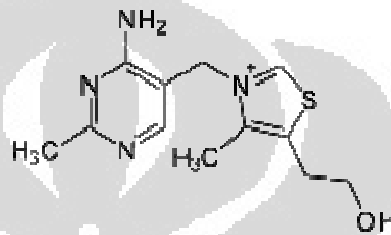
Vitamin B₁ atau tiamin adalah vitamin yang dibutuhkan oleh tubuh manusia dalam jumlah mikro berasal dari asupan gizi yang dikonsumsi oleh manusia, dan berfungsi sebagai katalisator transformasi makronutrien. (Rylich, Michael, 2011)

Tiamin dapat berbentuk sebagai tiamin difosfat dan tiamin pirofosfat yang berfungsi sebagai koenzim dalam metabolisme karbohidrat dan protein. Molekul tiamin tersusun atas pirimidin tersubstitusi dan komponen tiazol yang dihubungkan dengan jembatan metilen. Tiamin merupakan senyawa amina kuartener dan berada dalam bentuk kation monovalen atau divalen, tergantung pada pH larutan. (Eitenmiller, dkk, 2008)

Tiamin merupakan vitamin yang larut dalam air dan terdiri atas cincin pirimidin dan cincin tiazol (mengandung sulfur dan nitrogen) yang dihubungkan dengan jembatan metilen. Tiamin terdapat di alam dalam 2 bentuk yaitu bentuk bebas dan terikat sebagai kompleks dengan protein yaitu kompleks vitamin B₁-

fosfor protein dan ester dengan asam pirofosfat atau tiamin pirofosfat. Tiamin merupakan basa kuat, memiliki nitrogen dan terionisasi sempurna pada hampir semua kisaran pH, dimana gugus amino dari cincin pirimidin terionisasi dengan nilai $pK_a = 4,8$. (Eitenmiller, dkk, 2008, Andarwulan, dkk, 1992)

Tiamin mempunyai nama kimia menurut *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) adalah 2-[3-[(4-Amino-2-metil-piridin-5-yl)metil]-4-metil-tiazol-5-yl] etanol dengan rumus struktur seperti Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Struktur Tiamin

Tiamin tersedia dalam berbagai bentuk senyawa, dimana bentuk yang digunakan sebagai standar adalah tiamin hidroklorida. Tiamin hidroklorida mempunyai rumus formula $C_{12}H_{17}N_4OS^+Cl^- \cdot HCl$ dengan berat molekul 337.27 dan berbentuk tepung tidak berwarna. Tiamin hidroklorida mudah larut dalam air (1 gram dalam 1 mL air), alkohol (1 gram dalam 100 mL alkohol 90%, atau dalam 315 mL alkohol absolut atau dalam 18 mL gliserin). Tiamin hidroklorida tidak larut dalam eter, kloroform, benzene dan aseton, mempunyai titik cair $229-231^{\circ}C$. Tiamin hidroklorida cukup stabil dalam larutan asam kuat dan pada pH 3,5, dapat dipanaskan sampai $120^{\circ}C$ tanpa terjadi dekomposisi. Molekul tiamin hidroklorida dalam asam lemah dapat terpecah menjadi pirimidin dan tiazol, serta pada pH netral dan basa sangat sensitif terhadap panas. (Eitenmiller, dkk, 2008, Andarwulan, dkk, 1992)

Tiamine dapat diukur secara kimia dan mikrobiologi dengan berbagai teknik deteksi seperti kromatografi, spektrofotometri, spektrofluorometri, dan dipisahkan menggunakan kolom yang bersifat polar dengan tahapan preparasi menggunakan teknik hidrolisa asam dan enzim yang diikuti dengan clean-up matriks sebelum di injeksi kedalam alat kromatografi. Tiamin dapat dilakukan

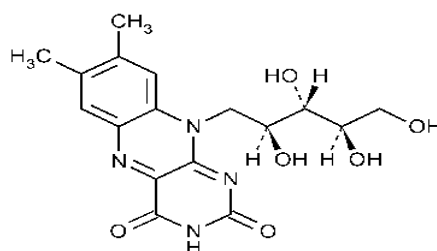
pengujian menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) menggunakan detektor UV-Vis dan fluoresen. Tiamin memberikan puncak maksimal pada λ 246 nm (pH 2,9) dengan nilai ϵ sebesar $11.305 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dan memberikan 2 puncak maksimal pada λ 234 dan 264 nm (pH > 5,5), yang masing-masing berhubungan dengan pirimidin tersubstitusi dan komponen tiazol. (Nollet, Leo M.L. 2004)

Tiamin dapat diukur menggunakan detektor fluoresen menggunakan prinsip kerja reaksi tiamin dan ester fosfatnya dengan kalium heksasianoferrat (III) $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$, menghasilkan senyawa tiokrom yang berfluoresensi biru kuat pada panjang gelombang eksitasi dan emisi masing-masing pada 375 nm dan 432-435 nm. (De Man, John.M, 1999)

2.3. Vitamin B₂

Vitamin B₂ atau riboflavin pertama kali diisolasi dari susu dan dibutuhkan oleh tubuh manusia dalam jumlah mikro, berasal dari asupan gizi yang dikonsumsi oleh manusia. Riboflavin diperlukan untuk berbagai proses sel, metabolisme energi lemak, zat keton, karbohidrat dan protein serta berperan dalam pembentukan sel darah merah, antibodi dalam tubuh. Riboflavin merupakan vitamin yang larut dalam air dan terdiri atas cincin trisiklik bernama isoalloksazin yang berikatan dengan turunan alkohol yaitu ribitol. (Eitenmiller, dkk, 2008)

Menurut *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) nama kimia riboflavin adalah 7,8-dimetil-10-[(2R,3R,4S)-2,3,4,5-tetrahidropentil] benzo[g]pteridien-2,4(3H,10H)-diona dan mempunyai rumus struktur seperti dalam Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Struktur Riboflavin.

Riboflavin atau vitamin B₂ merupakan turunan isoaloksazin dengan rantai samping ribitol. Riboflavin merupakan tepung berwarna kuning dengan rumus empiris C₁₇H₂₀N₄O₆, berat molekul 376,36 dan mempunyai titik leleh 282⁰C. Riboflavin murni sangat mudah larut dalam air (12 mg dalam 100 mL air pada 27,5⁰C atau 19 mg pada 40⁰C) dan dalam etil alkohol (94,5 mg dalam 100 mL pada 27,5⁰C), amil alkohol, siklo-heksanol, fenol, amil asetat dan sangat larut dalam alkali. Riboflavin tidak larut dalam aseton, eter, benzen dan kloroform.(Eitenmiller,dkk, 2008, Andarwulan, dkk, 1992).

Riboflavin memiliki nama kimia lainnya 7,8-dimetil-10(1'-D-ribitol) isoaloksazin dan 6,7 dimetil-9,d-riboflavin. Cincin isoaloksazin pada riboflavin disebut cincin flavin. Cincin flavin termetilasi diposisi 7 dan 8., terfosforilase diposisi 5' di rantai samping ribitol menghasilkan flavin mono-nukleotida(FMN). Penambahan adenosin-5'-monofosfat menghasilkan flavin adenin dinukleotida (FAD). Ikatan karbon-nitrogen yang menghubungkan rantai samping ribitol ke isoaloksazin bersifat stabil terhadap hidrolisis asam, FMN dan FAD bersifat mudah berubah menjadi riboflavin pada pH dibawah 5,0. (De Man, John.M, 1999).

Riboflavin, FMN dan FAD menunjukkan serapan maksimal pada panjang gelombang (λ) 223, 266, 373 dan 445 nm, dan dapat mengalami pergeseran serapan maksimum pada panjang gelombang (λ) 370 dan 450 nm, karena terjadinya oksidasi flavin dan flavo-protein yang dipengaruhi oleh kondisi pelarut. Riboflavin dapat juga mengalami pergeseran panjang gelombang menjadi 220 – 270 nm karena terjadi reduksi flavin dan flavinprotein yang menghasilkan spektrum yang tidak umum, yang dapat menyulitkan interpretasi data spektroskopi.(Eitenmiller, dkk, 2008, Andarwulan, dkk,1992)

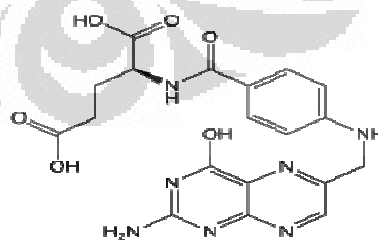
Riboflavin memiliki sifat fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 440-550 nm, emisi =520-530 nm). Riboflavin dan FMN berfluoresensi hampir sama, sementara FAD berfluoresensi kurang kuat dibanding riboflavin dan FMN.

Riboflavin yang terikat dengan kompleks protein dalam bentuk FMN dan FAD dapat dihidrolisa dengan asam menghasilkan senyawa riboflavin bebas yang memiliki fluoresensi pada panjang gelombang emisi = 565 nm dan eksitasi pada 440 nm. Riboflavin dapat dirubah menjadi lumiflavin pada kondisi basa yang memiliki sifat fluoresensi pada pada panjang gelombang (λ) emisi=513 nm, dan panjang gelombang (λ) eks= 450 nm).(Eitenmiller,dkk, 2008)

Riboflavin dapat dipisahkan dengan kolom menggunakan fase diam C_{18} yang bersifat polar dengan fase gerak berair/organik atau menggunakan agen pasangan ion (heksan atau heptan asam sulfonat).(Eitenmiller, dkk, 2008)

2.4. Vitamin B₉

Asam Folat atau vitamin B₉ pertama kali diisolasi dari daun bayam tahun 1941 oleh Mitchell dkk. Asam folat tidak ditemukan di alam, dengan bentuk sintetik yang lebih stabil serta digunakan untuk fortifikasi makanan dan untuk sediaan farmasetik. Menurut *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) nama asam folat adalah [(2*S*)-2-[(4-[(2-amino-4-hidroksipteridin-6-yl)metil] amino } phenil) formamida] pentanedinoic acid dan mempunyai rumus struktur seperti pada Gambar 2.3..



Gambar 2.3. Struktur Asam folat

Asam folat atau folasin tersusun dari 2-amino-4-hidroksi pteridin dan asam p-amino benzoat yang mengikat asam P-Amino Bezoat Glutamat (PABG). Asam folat memiliki rumus empiris $C_{19}H_{19}N_7O_6$ dengan berat molekul 441,4,

dengan bentuk berupa tepung berwarna kuning sampai orange kekuningan, memiliki titik leleh. Asam folat sangat mudah larut dalam alkali encer, larut dalam asam encer, dan sedikit larut dalam air (0,16 mg per 100 mL air pada suhu 25⁰C, 1 gram per 100 mL pada 100⁰C), tidak larut dalam alkohol, aseton, eter dan kloroform. Asam folat bersifat stabil terhadap basa, namun masih dapat dihidrolisa dengan asam dengan memecah rantai samping sehingga dihasilkan PABG dan asam p-terin-6-karboksilat.(Andarwulan, dkk, 1992)

Asam folat memiliki senyawa induk asam pteroiat, asam 4-[(pteridin-6-ilmetil)amino] benzoat merupakan kelompok senyawa heterosiklik dengan struktur asam pteroiat yang terkonjugasi dengan satu atau lebih L-glutamat yang dihubungkan melalui gugus γ -karbonil asam amino. Asam folat mengandung residu satu asam glutamat dengan nama "asam pteroilglutamat". Asam folat dapat direduksi menjadi folat H₂ atau tetrahidrofolat (H₄ folat). Tetrahidrofolat yang merupakan bentuk koenzim vitamin yang aktif.(Eitenmiller, dkk, 2008, Andarwulan, dkk, 1992)

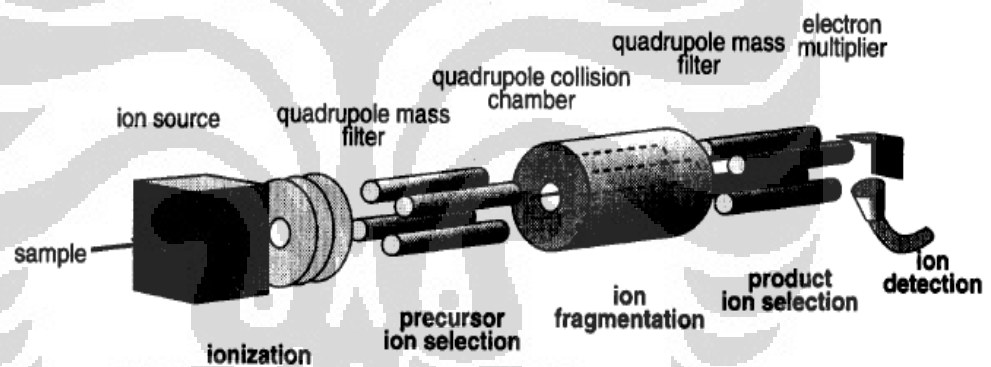
Asam folat mempunyai kelarutan minimum pada pH 2-4, dimana bentuk-bentuk netral dan mono-kationik mendominasi, kelarutan meningkat sebanding dengan peningkatan pH diatas kisaran pH tsb, karena spesies anionik meningkat konsentrasinya. Kelarutan asam folat meningkat pada pH yang sangat rendah dalam larutan yang sangat asam. Pada pH yang sangat rendah, maka spesies kationik mendominasi. Asam pteroiat kurang larut dibandingkan asam folat disepanjang skala pH. Kelarutan asam folat dipengaruhi oleh karakter hidrofilik polar dari gugus karboksil asam glutamat. Pada level pH netral sampai alkali, poliglutamil folat bersifat lebih anionik dibanding asam folat karena adanya tambahan gugus karboksil yang terionisasi. Folat poliglutamil rantai panjang lebih bersifat hidrofobik dibanding folat poliglutamil rantai pendek pada pH rendah, yang mana gugus karboksil berada dalam bentuk terprotonasi. (Eitenmiller, dkk, 2008, De Man, John.M, 1999)

Analisis asam folat dapat menggunakan metode kromatografi cair dengan detektor fluoresen dan photo diode array. Asam folat dapat juga dilakukan dengan

kromatografi cair yang digabungkan dengan spektrometer massa (MS). Asam folat dapat dibebaskan dari bentuk terikat dengan digesti atau destruksi matriks yang dilanjutkan dengan hidrolisis enzim amilasi. Pemisahan asam folat dapat dilakukan dengan kromatografi penukar ion dan fase fase terbalik menggunakan detektor uv-vis, fluoresensi dan elektrokimia. (Nollet, Leo M.L .2004).

2.5. Kromatografi cair- Tandem Spektrometri Massa (LC-MS/MS)

Kromatografi cair tandem spektrometri massa disingkat LC-MS/MS merupakan pengembangan teknologi dan kombinasi antara kromatografi cair dengan spektrometri massa yang mampu menganalisis dengan tingkat sensitifitas, selektifitas yang lebih baik. Komponen utama instrumentasi LC-MS/MS dapat terdapat pada Gambar 2.4 berikut :



Gambar 2.4. Skema LC-MS/MS

(sumber. Hoffman, Journal of mass spectrometry vol.31 pp 129-137, 1996)

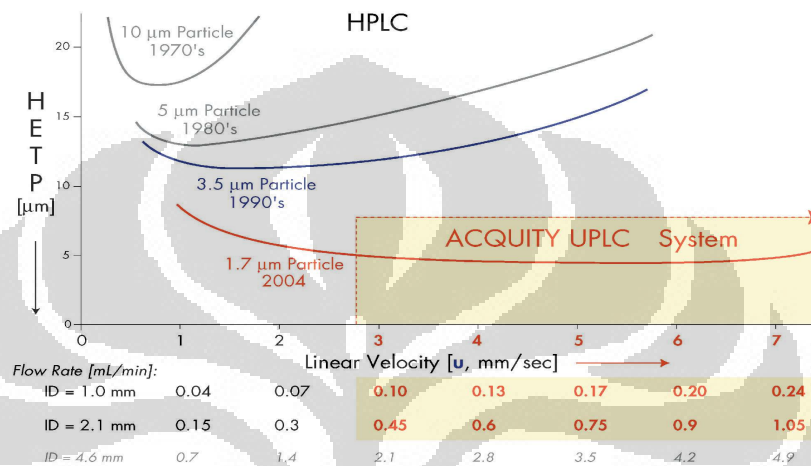
Tahapan proses yang terjadi dalam alat kromatografi cair tandem spektrometri massa (LC-MS/MS) terdiri dari : Sampel yang dipisahkan oleh kolom kromatografi cair, masuk chamber ionisasi melalui kapiler, dilakukan ionisasi dengan tehnik ionisasi elektrospray (ESI) diteruskan ke quadrupole 1 untuk dilakukan analisis atau seleksi ion precursor berdasarkan nilai m/z , selanjutnya dilakukan fragmentasi di dalam collision cell dan hasil fragmentasinya dianalisis atau diseleksi oleh quadrupole 2, diteruskan ke detektor.

Pada kegiatan penelitian ini digunakan instrumen analitik kromatografi cair tandem spektrometri massa (LC-MS/MS) untuk analisa kualitatif dan kuantitatif senyawa vitamin B₁, B₂, B₉ dalam matriks tepung terigu secara simultan. Kromatografi adalah metoda pemisahan dimana komponen-komponen (dalam fasa cair) yang akan dipisahkan didistribusikan antara dua fasa, salah satunya merupakan lapisan stasioner (fasa diam) dengan permukaan yang luas dan fasa lain berupa fase gerak yang mengalir sepanjang lapisan stasioner. Fasa diam dapat berupa zat padat atau cairan dan fasa geraknya adalah cair. Kromatografi cair melakukan pemisahan menggunakan kolom dengan ukuran partikel tertentu, menggunakan fase gerak sesuai dengan kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan.

Kromatografi merupakan teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan interaksi antara analit dalam fase gerak dengan fase diam dalam kolom. Molekul yang terlarut dalam fase gerak akan melewati kolom yang terdapat fase diam, dimana molekul yang memiliki ikatan yang kuat dengan fase diam kolom akan cenderung bergerak lebih lambat dibanding dengan molekul yang berikatan lemah. Kolom merupakan inti dari kromatografi yang mempunyai fungsi untuk memisahkan ion atau molekul dalam suatu larutan. Kolom kromatografi yang lebih dikenal dengan istilah fase diam dapat bersifat polar, dan non polar dengan ukuran partikel tertentu. Penggunaan ukuran partikel dalam analisis Kromatografi pada dekade tahun 1970-an adalah 10 μm , dan berkembang menjadi 5 μm diawal tahun 1980, selanjutnya tahun 1990-an ukuran partikel berkembang menjadi 3,5 μm . Tahun 2004, mulai dikembangkan kolom dengan ukuran yang lebih kecil lagi yaitu dibawah 2,5 μm . (Robart, K. Haddad, P. R. Jackson, P. E 2001).

Evolusi partikel kolom kromatografi cair memberikan manfaat yang luar biasa terhadap perkembangan teknik pemisahan yaitu dapat meningkatkan kemampuan dalam bidang resolusi pemisahan, kecepatan dan sensitifitas analisis. Adanya penurunan ukuran partikel hingga dibawah 2,5 μm akan memberikan dampak yang signifikan terhadap efisiensi pemisahan, laju alir, kapasitas puncak, selektifitas dan sensitifitas. Efisiensi pemisahan analit oleh kolom dinyatakan dalam resolusi atau R dan berbanding lurus dengan akar N atau akar jumlah plate. Nilai N sangat ditentukan oleh ukuran partikel atau berbanding terbalik

dengan ukuran partikel, dimana nilai N semakin besar dengan semakin kecilnya ukuran partikel. Nilai N atau jumlah plate adalah berbanding terbalik dengan H.E.T.P dimana semakin besar nilai N maka nilai H.E.T.P akan semakin kecil atau turun. Bilai N semakin besar atau H.E.T.P semakin kecil maka kemampuan pemisahan atau efisiensi pemisahan akan semakin besar. Pengaruh ukuran partikel terhadap penurunan nilai H.E.T.P dapat di ilustrasikan dalam Gambar 2.5.

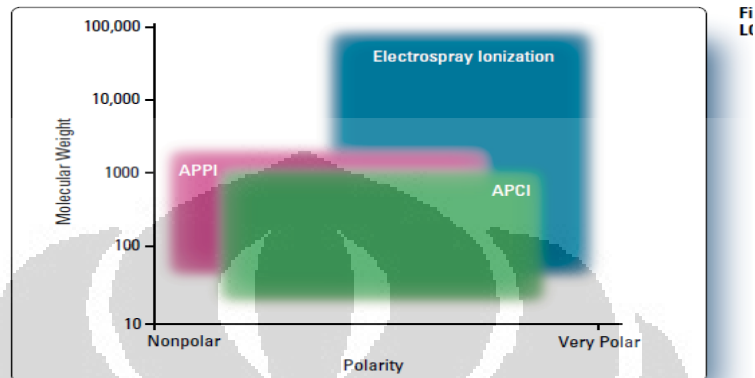


Gambar 2.5. plot van deemter, ilustrasi perkembangan ukuran partikel kolom terhadap nilai HETP (Swartz, Michael E & Murphy, Brian J, 2004)

Berdasarkan kurva diatas menunjukkan bahwa ukuran partikel semakin kecil akan menurunkan nilai H.ET.P, meningkatkan efisiensi, kecepatan, dan kapasitas puncak. Kolom dengan ukuran dibawah 2 µm(UPLC) memiliki keunggulan dapat dijalan dengan panjang kolom yang lebih pendek, resolusi yang lebih baik, lebih cepat, sensitifitas yang lebih baik karena puncak lebih sempit dan puncak yang lancip.

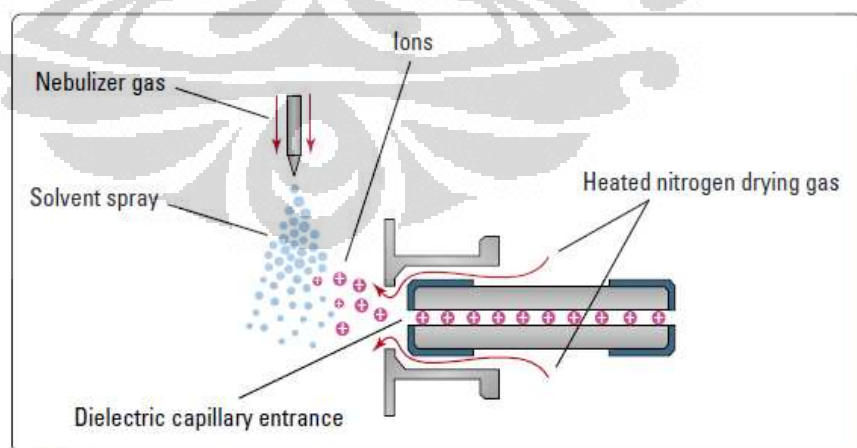
Sumber Ionisasi adalah komponen dari instrumentasi yang melakukan ionisasi sampel sehingga dapat dilakukan analisis oleh *mass analyzer*. Terdapat beberapa jenis ionisasi yang digunakan dalam instrumentasi kromatografi cair tandem spektrometri massa seperti ESI, APCI dan APPI. Teknik ionisasi elektro spray merupakan tehnik yang umum digunakan karena merupakan teknik *ionisasi* lunak dengan ruang-lingkup senyawa yang dapat diionisasi lebih banyak dan lebih cocok untuk ionisasi senyawa yang bersifat polar. Penerapan tehnik

ionisasi dan perbandingan ruang-lingkup penerapan teknik ionisasi terhadap kepolaran senyawa dapat dilihat pada Gambar 2.6. Teknik ionisasi *electrospray* pada awalnya ditujukan untuk analisis protein, kemudian berkembang untuk polimer, biopolimer, dan analisis molekul polar dalam jumlah sedikit.



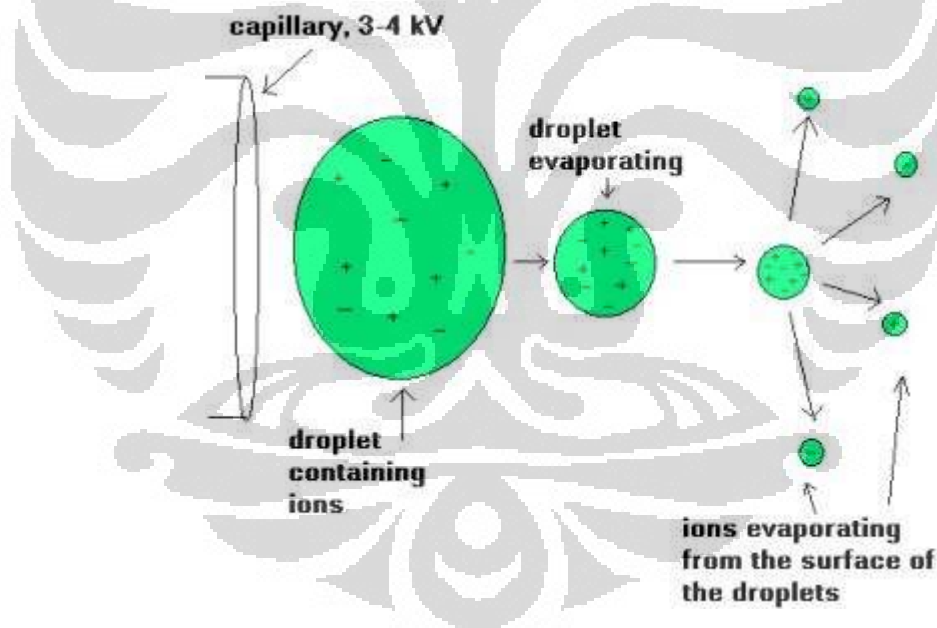
Gambar 2.6 Aplikasi berbagai teknik ionisasi APPI, APPI, ESI terhadap kepolaran (Manual Part Number, Agilent 6400, 2009)

Metoda *ionisasi* ESI dilakukan dengan tahapan dimana larutan dari analit disemprotkan dengan laju alir 1 – 20 μL melalui kapiler kedalam chamber (tempat), seperti terlihat pada Gambar 2.7. dan terjadi ionisasi dengan dibantu nebulizer.



Gambar 2.7. Ionisasi *electrosparay* (Manual Part Number, Agilent 6400, 2009)

Ionisasi elektrospray (ESI) adalah teknik ionisasi pada tekanan atmosfer (API) dan sangat baik untuk analisis molekul polar dengan rentang massa molekul 100 hingga lebih dari 1,000,000 Dalton. Proses ionisasi yang terjadi adalah sampel dalam pelarut polar yang mudah menguap dipompa melalui kapiler (diameter dalam 75 – 150 micrometer) dengan laju alir 1 – 20 $\mu\text{L}/\text{menit}$. Potensial/Voltase tinggi 3 – 4 kV diberikan pada ujung kapiler dan dinding kapiler yang merupakan sumber ionisasi dari spektrometri massa, tetesan bermuatan yang dihasilkan menjadi uap dan digerakkan sehingga terjadi proses desolvasi, dibantu dengan aliran gas nebulizer nitrogen. Tetesan dari aerosol yang bermuatan tinggi dan bebas dari pelarut didorong dengan bantuan drying gas. Sampel dalam bentuk ion (bebas pelarut) melewati sampling cone menuju daerah vacuum intermediate selanjutnya massa yang mempunyai vacuum lebih tinggi. (De Hoffman, E & Stroobant, V 2008) Proses diatas dapat dilihat pada Gambar 2.8.



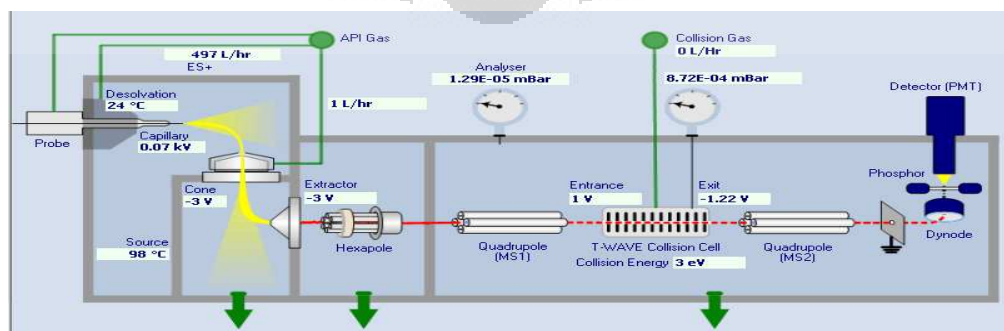
Gambar 2.8. Proses ionisasi elektrospray (Gaskell, Simon, J. 1997),

Ionisasi dapat dilakukan dalam dua mode yaitu mode + (positif) dan – (negatif), dimana saat mode positif ditambahkan sejumlah kecil asam seperti asam format untuk membantu protonasi dari molekul sampel, dan untuk mode negatif

ditambahkan sejumlah kecil larutan basa seperti ammonia atau amin yang mudah menguap untuk membantu deprotonasi dari molekul sampel.

Spektrometri massa adalah suatu teknik untuk merubah ion fase gas dari atom atau molekul dalam sampel, dipisahkan berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z), dan diukur kelimpahannya (abundance). Spektrometri massa saat ini merupakan teknik yang paling banyak digunakan untuk analisis instrumentasi. Spektrometri massa dapat memberikan informasi tentang struktur dari senyawa dan dapat juga digunakan sebagai dasar pengukuran kualitatif dan kuantitatif, hingga konsentrasi per per billion. Spektrometri massa telah digunakan untuk analisis kuantitatif berbagai campuran dari gas, cairan dan padatan, serta telah digunakan untuk identifikasi dan kuantifikasi molekul organik dan biologi. (De Hoffman, E & Stroobant, V 2008),

Spektrometri massa adalah instrument yang memisahkan atom, molekul terionisasi dalam fase gas berdasarkan perbedaan nilai m/z nya, dimana m adalah massa unit atom dan z adalah jumlah muatan dari ion. *Mass Analyzer* adalah inti dari spektrometri massa, yang berfungsi untuk melakukan analisis terhadap ion berdasarkan m/z . *Mass Analyzer* adalah komponen yang melakukan pemisahan ion hasil ionisasi berdasarkan perbedaan m/z masing-masing molekul. Terdapat beberapa jenis analyzer massa seperti *Single Quadrupole*, *Triple Quadrupole*, *Ion Trap*, *Hybride*, *QTOF*, dan lain-lain. *Triple Quadrupole* adalah yang paling sering digunakan oleh para peneliti. *Triple quadrupole* terdiri dari 3 *Quadrupole* Q1, Q2 (*Collision Cell*) dan Q3 seperti tercantum dalam Gambar 2.9.



Gambar 2.9. Skema *Triple Quadrupole* (Waters ACQUITY TQD SYSTEM MANUAL GUIDE, 2010)

Analyzer yang digunakan dalam kromatografi cair Tandem spektrometri massa terdiri dari 2 *Quadrupole* yang dipisahkan oleh satu *collision sel*. *Quadrupole* 1 (Q1) dan 3 (Q2) berfungsi sebagai *mass analyzer* dan satu berfungsi sebagai *Q2 Collision cell*.

Terdapat beberapa jenis eksperimen yang dapat dilakukan dalam kromatografi cair tandem spektrometri massa triple quadrupole (QQQ atau TQD) yaitu :

- Identifikasi dan seleksi ion produk.

Ion produk diidentifikasi menggunakan *quadrupole* Q1 berdasarkan m/z dan ditransfer ke Q2 atau *collision cell*. Di dalam *collision cell* terjadi tumbukan dan interaksi dengan gas *collision* dan fragmen lainnya menghasilkan ion produk. Ion produk hasil fragmentasi diukur oleh *quadrupole* Q3. Jenis percobaan ini dikenal dengan MS-MS Scan yang menghasilkan MS-MS spektrum, dan metoda ini biasanya dilakukan umum dengan tehnik ionisasi *elektrospray* (ESI). (De Hoffman, E & Stroobant, V 2008) Identifikasi ini terdapat dalam Gambar 2.10 skema 1.

- Identifikasi dan seleksi ion prekursor

Kondisi ini merupakan identifikasi dan analisis ion precursor berdasarkan kondisi optimal hasil ionisasi dan dipilah berdasarkan m/z ion precursor. Hal ini disebut dengan precursor scan, menggunakan mode yang terpisah antara quadrupole 1 dan 2. Pada saat dilakukan scanning salah satu quadrupole dalam kondisi fix sementara yang satu lagi melakukan identifikasi dan analisis ion precursor, hal ini sering dikenal dengan MS-SCAN. Semua ion yang dihasilkan dilakukan identifikasi nilai m/z nya dengan cara seleksi m/z yang cocok dengan berat molekul senyawa yang akan diidentifikasi. Identifikasi ini terdapat dalam Gambar 2.10 skema 2.

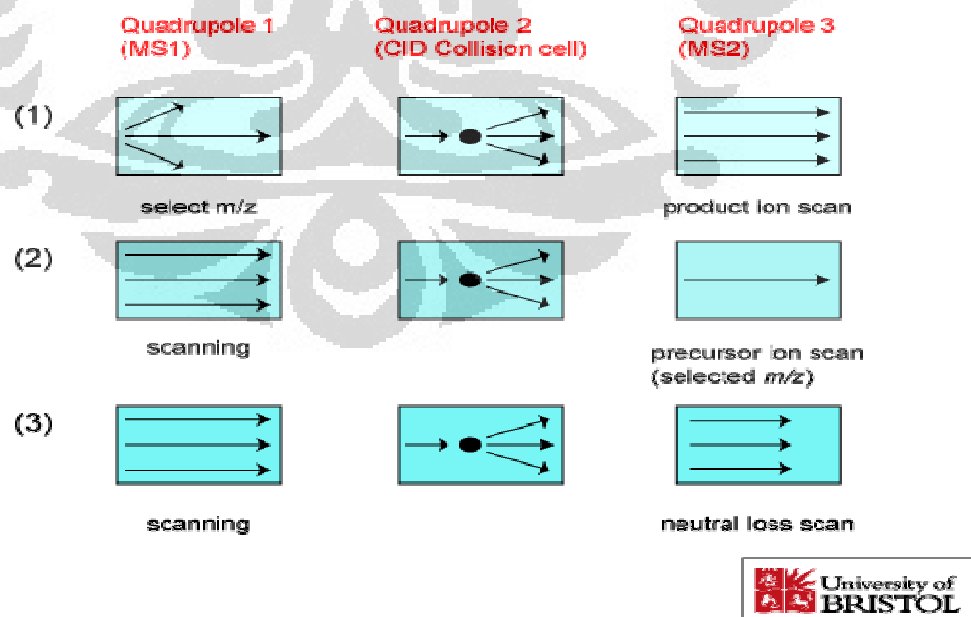
- Identifikasi dan analisis ion netral yang hilang.

Kondisi ini merupakan analisis fragment netral dan mendeteksi semua fragmentasi yang mengarah kepada hilangnya ion netral. Scan jenis ini membutuhkan spektrometri keduanya secara bersamaan. Identifikasi ini terdapat dalam Gambar 2.10 skema 3.

- Pemantauan Reaksi Selektif (MRM)

Pemantauan reaksi selektif atau Selected Reaction Monitoring disingkat MRM adalah tehnik berdasarkan prinsip pemilihan ion precursor dan ion produk tertentu sesuai nilai m/z yang diinginkan, yang dapat diidentifikasi oleh alat LC-MS-MS. Kondisi ini merupakan pemilihan reaksi fragmentasi yang spesifik dan selektif yang dapat mengukur secara spesifik. Untuk scanning ini, quadrupole 1 dan 2 kondisi On dan fokus pada pemilihan atau seleksi massa tertentu. Metoda ini analog terhadap terhadap pemilihan m/z secara spesifik dimana yang terdeteksi hanya ion dengan m/z yang diinginkan. (De Hoffman, E & Stroobant, V 2008),

Seluruh kondisi eksperimen kromatografi cair tandem spektrometri massa (LC-MS-MS) diatas dapat dijelaskan dalam Gambar 2.10.



Gambar 2.10. Proses eksperimen dalam LC-MS/MS (Bristol University, 2010)

2.6. Unjuk kerja metoda uji. (Harmita,2004)

Menurut ISO/IEC 17025, suatu metoda uji sebelum digunakan oleh laboratorium harus mempunyai kinerja yang memenuhi persyaratan. Persyaratan unjuk kinerja suatu metoda uji adalah : akurasi, presisi atau ketelitian, batas deteksi, batas kuantitasi, linearitas dan rentang ukur.

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi ditentukan dengan melakukan analisis bahan yang sudah diketahui nilainya, baik standar baku bersertifikat (CRM) maupun standar adisi terhadap matriks yang sesuai. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (rekoveri) analit yang ditambahkan atau dibandingkan dengan yang terdapat dalam standar baku bersertifikat.

Ketelitian atau presisi adalah kedekatan antara hasil pengujian satu ulangan dengan ulangan yang lainnya. Ketelitian merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuan metoda uji mengukur zat tertentu saja secara spesifik dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas sering kali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemar, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan yang ditambahkan.

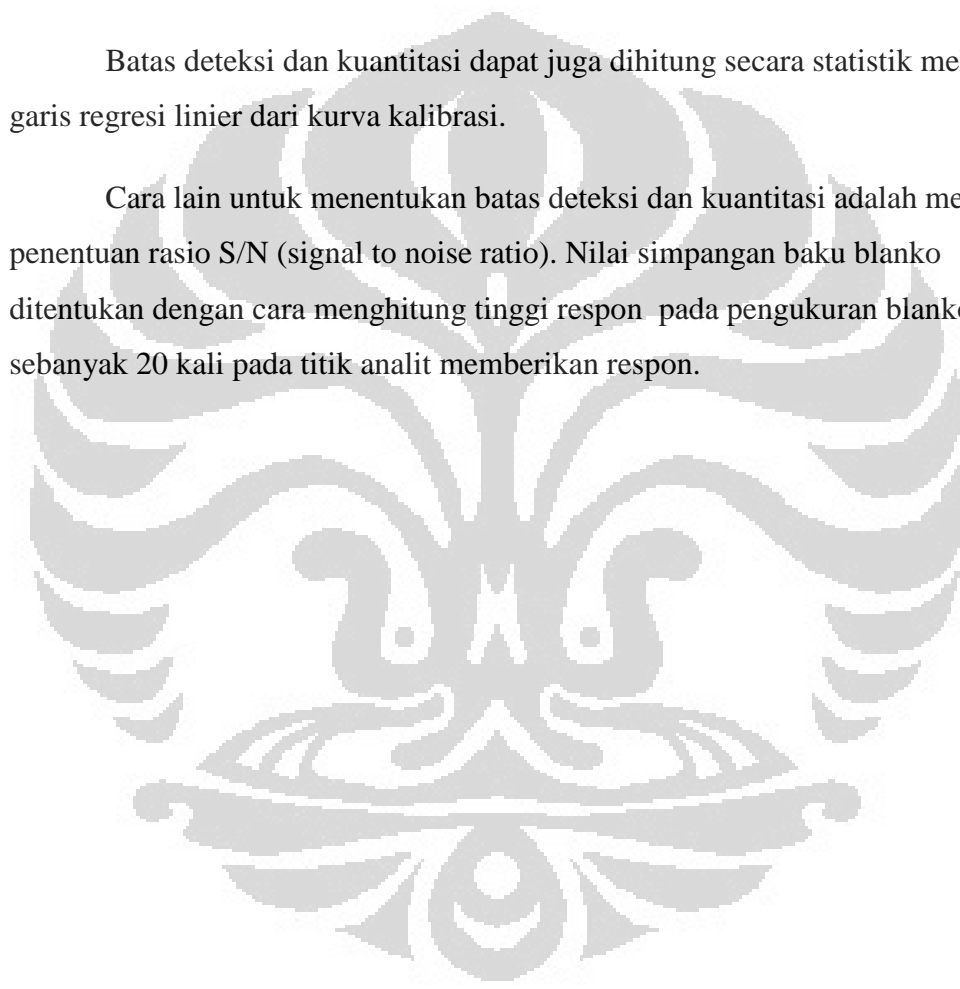
Linearitas adalah kemampuan metode uji memberikan respon secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan

batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Batas deteksi dan kuantitasi dapat juga dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi.

Cara lain untuk menentukan batas deteksi dan kuantitasi adalah melalui penentuan rasio S/N (signal to noise ratio). Nilai simpangan baku blanko ditentukan dengan cara menghitung tinggi respon pada pengukuran blanko sebanyak 20 kali pada titik analit memberikan respon.



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di laboratorium pengujian PT. Sucofindo, Cibitung, Bekasi pada bulan Agustus 2010 – September 2011 dan laboratorium Loka Penyidikan Penyakit Ikan Anyer, Direktorat Budidaya Kementerian Kelautan dan Perikanan pada bulan Oktober –November 2011.

3.2 Bahan dan alat

3.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang dipergunakan adalah:

Standar murni senyawa vitamin B₁, B₂, B₉ terdiri dari standar Tiamin Hidroklorida, Riboflavin, Asam folat (Sigma Aldrich).

Pelarut metanol (Merck), kromatografi grade.

Ammonium asetat(Merck).

Aquabidest, deionisasi ganda, dari *Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA)*, resistivity 18,2 MΩ-cm, disaring melalui filter membran 0,2 µm.

Sampel tepung terigu yang diperoleh dari pasar.

Standar baku bersertifikat “BCR 121”

3.2.2 Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah

Alat-alat gelas yang ada di laboratorium kimia seperti: labu ukur, gelas ukur, pipet, *sentrifuse*, *vial*, *shaker*, *vortex*, timbangan, mikropipet, *syringe*.

Kromatografi cair (LC) Agilent 6430 Triple Quadrupole Mass Spectrometer(QQQ), Binary pump 1290 infinity model G4220A, *ionisasi elektropray* mode positif, MRM system.

Kolom kromatografi cair Agilent Zorbax RRHt SB-aq 3,0 mm x 100 mm, 1,8 µm.

Kromatografi cair (LC) Waters Acquity UPLC Hclass, Triple Quadrupole (TQD) MSMS-MassLynx 4,1 SCN714.

Kolom kromatografi cair Acquity UPLC BEH C₁₈ 1,7 µm (2,1 mm x 50 mm).

Kolom kromatografi cair Acquity UPLC BEH C₈ 1,7 µm (2,1 mm x 50 mm).

Kolom kromatografi cair Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm (2,1 mm x 30 mm).

3.3 Prosedur penelitian.

3.3.1 Penelitian di Laboratorium Sucofindo dengan alat merk Agilent

Pelaksanaan penelitian yang dilakukan di laboratorium Sucofindo adalah uji kinerja alat, identifikasi ion prekursor, ion produk dan melakukan optimasi kondisi ion prekursor dan ion produk, pengukuran linearitas, resolusi, rentang, presisi serta pengukuran sampel matriks tepung terigu dengan tahapan prosedur berikut.

3.3.1.1 Identifikasi ion prekursor dan ion produk

Larutan standar murni vitamin B₁, B₂ dan B₉ di injeksi menggunakan alat kromatografi cair tandem spektrometri massa (LC-MS/MS) dengan volume 1 µl tanpa melewati kolom untuk identifikasi ion prekursor dan ion produk. Kromtogram yang dihasilkan dilakukan evaluasi dan dibandingkan dengan beberapa literatur dan ditetapkan ion prekursor dan ion produk masing-masing vitamin.

3.3.1.2 Optimasi ion prekursor dan ion produk

Berdasarkan nilai m/z yang diidentifikasi pada sub. bab 3.3.1.1 diatas dilakukan optimasi untuk memperoleh relatif respon optimal masing-masing vitamin dengan melakukan variasi *collision induced dissociation* (CID), *nebulizer*, laju alir gas, temperatur gas, sementara parameter lainnya mengikuti ketentuan yang ditetapkan dalam manual alat. Hasil kromatogram yang diperoleh dibuat

grafik antara variasi parameter yg dilakukan sebagai sumbu x dan respon relatif sebagai sumbu y. Nilai optimal ditetapkan berdasarkan nilai optimal relatif respon yang diperoleh. Setelah diperoleh kondisi optimal masing-masing vitamin maka dilakukan injeksi standar campuran dan ditetapkan kondisi optimal campuran vitamin.

3.3.1.3 Penentuan Resolusi pemisahan menggunakan kolom.

Setelah diperoleh kondisi optimal pada sub-bab 3.3.1.2 diatas dilakukan injeksi larutan standar campuran dengan melewati kolom kromatografi cair. Hasil kromatogram yang diperoleh dihitung resolusi atau daya pisah dari kolom terhadap masing-masing vitamin dan dibandingkan dengan literatur.

3.3.1.4 Penentuan Linearitas dan Rentang kerja

Penentuan Linearitas dilakukan dengan menginjeksikan campuran standar Vitamin B₁, B₂, B₉ ke alat LC-MS/MS dengan deret standar berkisar 0 – 1000 ppb. Nilai respon relatif atau area yang diperoleh dibuat grafik antara konsentrasi standar sebagai sumbu x dan respon relatif sebagai sumbu y, dihitung koefisien korelasi dan persamaan regresinya. Nilai m/z yang digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi standar adalah nilai m/z ion produk. Rentang ukur pengukuran metoda dihitung dari deret kurva standar yang memberikan nilai koefisien korelasi optimal.

3.3.1.5 Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan melakukan injeksi standar terkecil yang masih dapat diidentifikasi sebagai puncak dengan respon atau area tiga kali diatas nilai respon noise. Konsentrasi terkecil yang diperoleh dikalikan dengan 3 kali rasio noise terhadap signal untuk batas deteksi dan dikalikan 10 untuk batas kuantitasi. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi juga dilakukan melalui kurva standar dengan rumus $Q = (k \times S_{y/x})/SI$ dimana $S_{y/x}$ adalah simpangan baku residual dan SI adalah simpangan baku

respon analitik blanko dengan nilai $k = 3$ untuk batas deteksi dan $k = 10$ untuk batas kuantitasi.

3.3.1.6. Pengukuran sampel.

Kondisi optimasi beserta kinerja metoda uji yang diperoleh sesuai prosedur sub bab 3.3.1.1 sampai 3.3.1.5 digunakan untuk melakukan pengujian sampel tepung terigu yang disampling pada beberapa kota di Indonesia. Prosedur preparasi sampel yang dilakukan pada penelitian ini adalah menimbang contoh $\pm 0,5$ gram, melarutkan dengan Ammonium Asetat 75 mmol (pH 7), melakukan vortex 15 menit dan ultrasonik 10 menit untuk membantu pelarutan, mengimpitkan kedalam labu ukur 50 ml, melakukan *sentrifuse* selama 30 menit dengan kecepatan 3000 rpm, mengambil supernatan 2 mL serta melarutkannya dengan fase gerak kedalam labu 50 mL, menyaring dengan filter 0,45 μm , injeksi ke alat kromatografi. Hasil kromatogram yang diperoleh dicatat nilai area ion produk masing-masing vitamin. Konsentrasi sampel dihitung dengan menggunakan persamaan kurva standar yang diperoleh pada sub bab. 3.3.1.4.

3.3.2 Penelitian di laboratorium Loka Penyidikan Penyakit Ikan Anyer dengan alat merk Waters.

Penelitian dengan menggunakan alat merk Agilent diatas tidak dapat dilanjutkan karena kondisi alat tidak memungkinkan untuk melakukan pengukuran karena respon yang diperoleh sangat kecil sehingga tidak dapat digunakan untuk data penelitian sampai dilakukan tuning kembali. Alat dapat digunakan kembali setelah tuning ulang, dengan waktu yang cukup lama yaitu 2-3 bulan karena menunggu pembelian larutan tuning indent selama 2-3 bulan.

Untuk itu dilakukan pengujian dengan alat yang berbeda tapi mengikuti pola dan kondisi yang hampir sama, yaitu menggunakan alat Waters Acquity UPLC Hclass dengan detektor Triple Quadrupole (TQD) MSMS-MassLynx 4,1 SCN714, kolom kromatografi cair Acquity UPLC BEH C₁₈ 1,7 μm (2,1 mm x 50 mm), kolom kromatografi cair Acquity UPLC BEH C₈ 1,7 μm (2,1 mm x 50 mm), di laboratorium Loka Penyidikan Penyakit Ikan Anyer.

Penelitian yang dilakukan ini adalah identifikasi ion prekursor, ion produk, dan optimasi kondisi fragmentasi masing-masing vitamin, pengujian linearitas, presisi, batas deteksi, dan akurasi.

3.3.2.1. Akurasi

Penentuan Akurasi dilakukan dengan melakukan pengujian terhadap standar baku bersertifikat BCR-121, dimana nilai akurasi dihitung dengan membandingkan antara nilai yang diperoleh saat analisis dengan nilai yang ditetapkan dalam sertifikat baku.

3.3.3. Penelitian menggunakan alat agilent dan kolom water aquity HSS T3

Memperhatikan hasil penelitian dengan kolom waters C_{18} kurang memuaskan maka dilakukan penelitian menggunakan kolom yang lebih cocok yaitu water aquity HSS T3. Penelitian yang dilakukan mengikuti kondisi yang diperoleh saat menggunakan kolom Zorbax, dengan parameter kinerja yang ditetapkan adalah mengikuti prosedur pada sub.bab 3.3.1.1 sampai 3.3.1.5 diatas.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk menganalisis kandungan vitamin B₁, B₂ dan B₉ dalam matriks tepung terigu diperlukan metode uji yang memiliki kinerja yang baik serta teknik deteksi yang mampu melakukan identifikasi maupun analisis kuantitatif secara simultan. Kromatografi cair tandem spektrometri massa (LC-MS/MS) merupakan alat yang dapat mengidentifikasi dan analisis kuantitatif secara simultan kandungan vitamin. Penelitian ini dilakukan menggunakan dua alat LC-MS/MS yang berbeda yaitu (1) LC-MS/MS Agilent 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (QQQ) dan (2) LC-MS/MS Waters Aquity UPLC Triple Quadrupole (TQD). Ke dua alat menggunakan tehnik ionisasi *elektrospray* dengan mode positif dan sistim pemantauan reaksi molekul atau molekul reaction monitoring yang disingkat MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

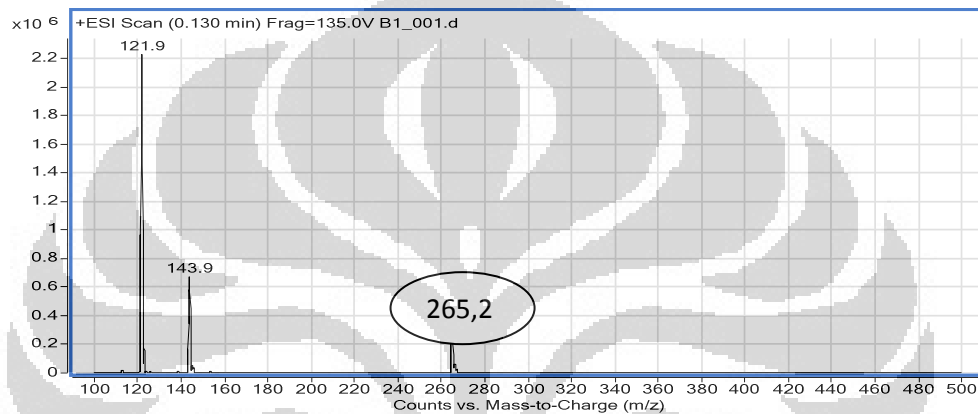
Dalam penelitian ini digunakan kolom *Zorbax RRHt SB-aq* 3,0 mm x 100 mm, 1,8 µm, *Acquity UPLC HSS T₃* 1,8 µm (2,1 mm x 30 mm) (untuk LC-MS/MS Agilent) dan *Acquity UPLC BEH C₁₈* 1,7 µm (2,1 mm x 50 mm), *Acquity UPLC BEH C₈* 1,7 µm (2,1 mm x 50 mm) untuk LC-MS/MS Waters. Untuk identifikasi dan optimasi digunakan larutan standar vitamin B₁, B₂, B₉ dengan konsentrasi 1 µg/L dalam pelarut 90 % air/10 % metanol dengan 20 mM ammonium format dan 0,1 % asam format.

4.1 Identifikasi ion prekursor vitamin B₁, B₂, B₉ dengan alat LC-MS/MS agilent

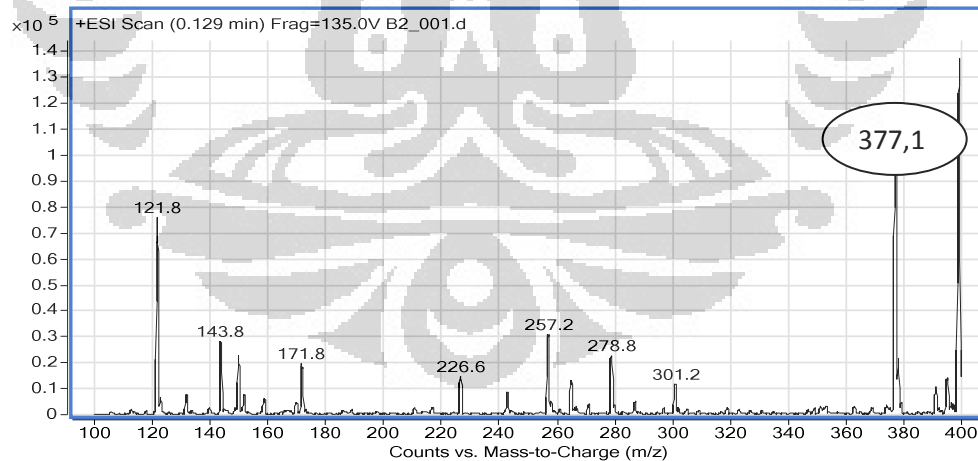
Identifikasi ion prekursor merupakan langkah kualitatif yang harus dilakukan untuk memastikan bahwa senyawa yang akan diukur secara kuantitatif adalah benar ion dari senyawa yang bersangkutan. Kondisi pengukuran untuk identifikasi ion prekursor mengikuti setting dari manual alat dan belum dilakukan penentuan kondisi optimal serta injeksi tanpa melewati kolom. Informasi nilai m/z larutan standar vitamin B₁, B₂ dan B₉ diperlukan untuk identifikasi massa molekul dari standar vitamin sebagai dasar dalam analisis baik secara kualitatif

maupun kuantitatif. Teknik yang dilakukan adalah menggunakan *full scan* atau *ms-scan* masing-masing larutan standar vitamin B₁, B₂, B₉ yang diikuti dengan teknik *Selective Ion Monitoring* (SIM). SIM adalah teknik yang digunakan dalam mengekstrak kromatogram untuk meningkatkan selektifitas dan rasio signal terhadap noise (S/N) dimana scanning hanya dilakukan terhadap massa molekul yang dipilih.

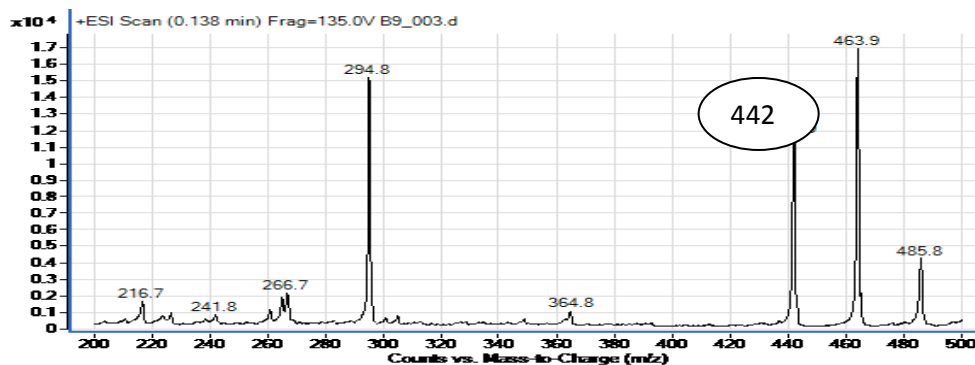
Injeksi larutan standar vitamin B₁, B₂, B₉ diperoleh spektrogram massa total ion (TIC) seperti terdapat dalam Gambar 4.1.sampai 4.3 berikut :



Gambar 4.1. Spektrogram massa total ion (TIC) standar vitamin B₁



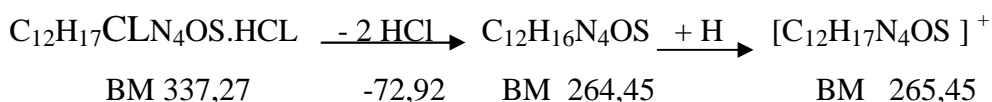
Gambar 4.2 Spektrogram massa ion (TIC) standar vitamin B₂



Gambar 4.3 Spektogram massa total ion (TIC) standar vitamin B₉

Spektogram massa total ion standar vitamin B₁ (tiamin hidroklorida) pada Gambar 4.1 menunjukkan adanya puncak pada m/z 265, 143,9 dan 121,9. Puncak pada m/z 265 identik dengan ion prekursor vitamin B₁. Puncak pada m/z 265 terjadi karena molekul tiamin hidroklorida (BM 337,27) terionisasi dengan melepaskan 2 molekul HCl sehingga terbentuk tiamin dengan BM 264,45 dan selanjutnya terjadi proses protonasi melalui penambahan satu atom hidrogen (via asam format) dengan berat molekul 265 yang identik dengan m/z 265. Hal diatas terjadi disebabkan karena sifat garam dari tiamin hidroklorida yang tidak stabil dan mudah terionisasi dan menerima satu atom Hidrogen dari asam, sehingga terjadi protonasi menghasilkan ion prekursor dengan berat molekul 265. Puncak pada m/z 121,9 dan 143,9 diidentifikasi sebagai puncak ion produk dari tiamin.

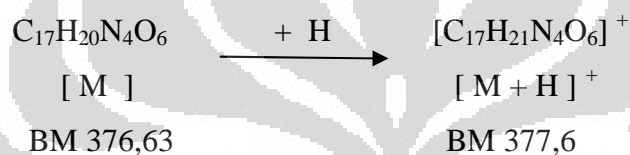
Larutan vitamin B₁ dalam bentuk garam hidroklorida dapat dengan mudah terionisasi melepaskan molekul asam klorida karena sifat basa kuat dari senyawa tiamin, memiliki nitrogen yang cukup banyak sehingga dapat terionisasi sempurna pada berbagai kisaran pH. Secara umum proses yang terjadi pada vitamin B₁ dapat digambarkan sebagai berikut (Gambar 4.4) :



Gambar 4.4. Proses ionisasi vitamin B₁

Berdasarkan data spektogram massa diatas serta proses ionisasi yang terjadi dapat disimpulkan bahwa ion prekursor untuk vitamin B₁ adalah pada m/z 265.

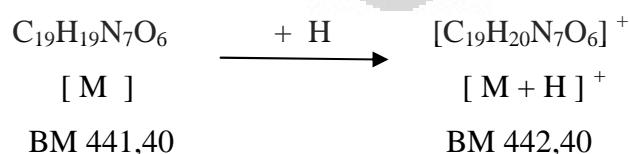
Spektogram massa total ion (TIC) standar vitamin B₂ pada Gambar 4.2 diatas menunjukkan adanya puncak pada m/z 377,6 yang diidentifikasi sebagai ion prekursor riboflavin. Hal ini dapat dijelaskan bahwa larutan standar vitamin B₂ yang diinjeksikan dalam bentuk netral yaitu laktoflavin dengan rumus empiris C₁₇H₂₀N₄O₆ dengan berat molekul 376,63. Laktoflavin mengalami proses ionisasi selama proses ESI melalui penambahan proton sehingga dihasilkan ion prekursor dengan penambahan berat molekul menjadi 377,6. Proses ionisasi yang terjadi pada vitamin B₂ adalah sebagaimana terdapat dalam Gambar 4.5 berikut.



Gambar 4.5. Proses ionisasi vitamin B₂

Berdasarkan data spektogram massa diatas dapat diidentifikasi dan disimpulkan bahwa ion prekursor vitamin B₂ adalah pada m/z 377,6.

Untuk vitamin B₉ larutan standar yang diinjeksikan dalam bentuk netral yaitu bentuk asam pteroil glutamat dengan rumus empiris C₁₉H₁₉N₇O₆ dengan berat molekul 441,40 bersifat relatif stabil, dan tidak stabil pada pH kurang dari 5 (Eitenmiller, 2008). Proses ionisasi vitamin B₉ berlangsung melalui penambahan proton sehingga dihasilkan ion prekursor dengan penambahan berat molekul menjadi 442. Proses yang terjadi pada vitamin B₉ adalah sebagaimana terdapat dalam Gambar 4.6.



Gambar 4.6. Proses ionisasi vitamin B₉

Hasil Spektogram massa total ion (TIC) masing-masing vitamin B₁, B₂, B₉ diatas menunjukkan adanya puncak pada m/z yang mencirikan ion prekursor yang

dapat digunakan sebagai dasar identifikasi. Rumus molekul, berat molekul dan ion prekursor dari masing-masing vitamin tercantum pada Tabel 4.1 berikut :

Tabel 4.1. Rumus molekul, berat molekul dan ion prekursor vitamin B₁, B₂, B₉

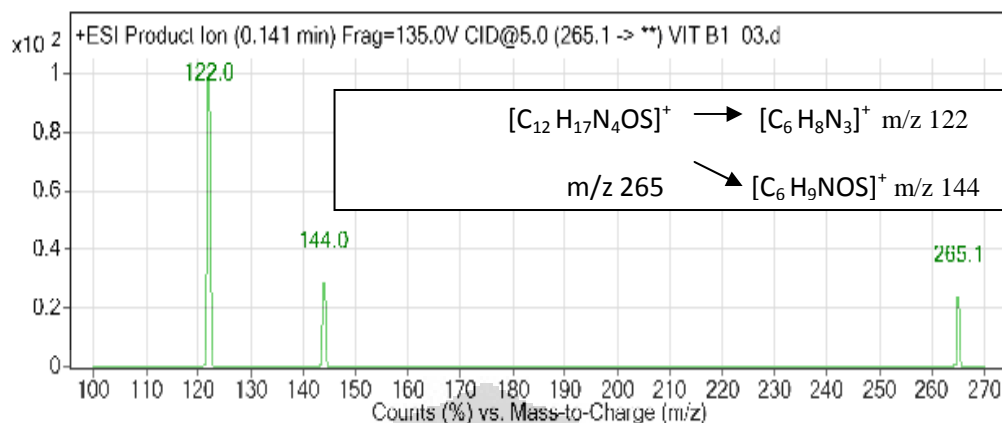
Analit	Rumus molekul	Berat molekul (g/mol)	Ion prekursor pada m/z
Vitamin B ₁ sebagai Tiamin hidroklorida	C ₁₂ H ₁₇ CLN ₄ OS.HCL	337,27	265
Vitamin B ₂ sebagai Laktoflavin	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	376,36	377
Vitamin B ₉ sebagai Asam Glutamat Pteroil	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441,40	442

4.2 Identifikasi ion produk vitamin B₁, B₂, B₉

Untuk memastikan bahwa ion prekursor yang diperoleh melalui proses diatas adalah merupakan identitas dari analit maka dilakukan fragmentasi terhadap masing masing ion prekursor mengikuti parameter yang ditetapkan oleh manual alat (Manual Part Number Agilent,2009). Tehnik yang digunakan adalah Pemantauan Reaksi Molekul atau *Multiple Reaction Molecule* (MRM) dimana tehnik ini menggunakan mode MS-MS Scan yang mampu secara spesifik memilah-milah fragmentasi dari ion prekursor sehingga yang terdeteksi hanya ion produk pada m/z tertentu dengan kondisi seluruh *quadrupole* (Q₁, Q₂, Q₃) dalam kondisi on.

Pada ion prekursor vitamin B₁, B₂, B₉ dilakukan scanning untuk memperoleh informasi ion produk, dengan memberikan energi pada *collision cell* sesuai dengan manual alat (agar dapat terjadi pemecahan molekul ion prekursor menjadi masing-masing ion produk.

Vitamin B₁ memiliki ion prekursor pada m/z 265, diberikan energi *collision* agar terjadi tumbukan dan fragmentasi sehingga dapat dideteksi oleh detektor dan menghasilkan ion produk. Hasil spektogram massa yang diperoleh adalah seperti tercantum dalam Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Spektogram massa fragmentasi vitamin B₁

Spektogram massa fragmentasi vitamin B₁ menggunakan MRM menunjukkan munculnya puncak pada m/z 122,0 dan 144,0 disamping puncak pada m/z 265,1 yang menunjukkan adanya ion prekursor vitamin B₁. Terdapat 2 puncak yang menunjukkan adanya 2 ion produk yang dapat dijelaskan dengan memperhatikan sifat kimia dari senyawa vitamin B₁ atau Tiamin.

Tiamin merupakan amina kuartener tersusun atas pirimidin tersubstitusi dan tiazol yang dihubungkan dengan jembatan metilen. Jembatan metilen merupakan ikatan yang paling lemah dalam struktur vitamin B₁ sehingga bila diberikan energi tumbukan tertentu akan terjadi pemutusan ikatan yang menghasilkan ion produk tiazol dan pirimidin seperti tercantum dalam Gambar 4.8. Ion produk tiazol diidentifikasi pada m/z 144 dan pirimidin dengan m/z 122 yang identik dengan berat molekul 143,21 dari tiazol C₆H₉ONS dan pirimidin C₆H₇N₃ dengan berat molekul 121,14. Pola fragmentasi yang terjadi dari molekul ion prekursor menjadi ion produk dari vitamin B₁ dapat dilihat pada Gambar 4.8 berikut :

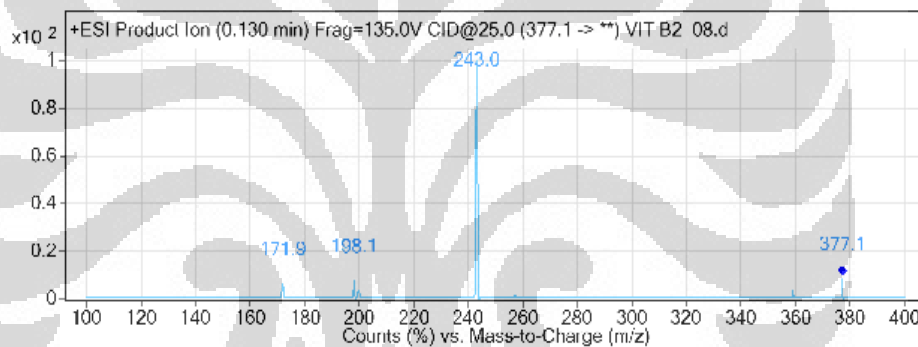


Gambar 4.8. Proses fragmentasi vitamin B₁

Berdasarkan data spektogram massa dan pola fragmentasi diatas dapat disimpulkan bahwa ion prekursor vitamin B₁ pada m/z 265 didukung oleh adanya

ion produk pada m/z 122 dan 144. Ion produk pada m/z 122 mempunyai respon relatif yang lebih tinggi dari ion produk pada m/z 144. Ion produk pada m/z 122 merupakan identifikasi adanya fragmentasi menjadi pirimidin dan m/z 144 menjadi tiazol. Ion produk pada m/z 122 memberikan respon relatif yang lebih tinggi dari m/z 144 sehingga area atau responnya digunakan sebagai dasar untuk penentuan kuantitatif dari vitamin B₁.

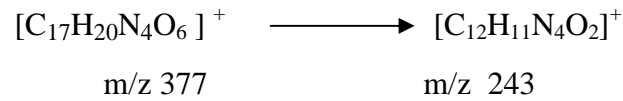
Untuk vitamin B₂ dilakukan strategi yang sama dengan vitamin B₁, analit diberikan energi *collision* agar terjadi tumbukan dan fragmentasi sehingga dapat dideteksi oleh detektor adanya ion produk. Spektogram massa vitamin B₂ menunjukkan adanya puncak pada m/z 243 yang merupakan indikasi adanya ion produk vitamin B₂ yaitu molekul lumikrom yang mempunyai berat molekul 242. Hasil spektogram massa yang diperoleh tercantum dalam Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Spektogram massa fragmentasi vitamin B₂

Spektogram massa vitamin B₂ menggunakan MRM menunjukkan munculnya puncak pada m/z 243,0 dan 198,1 disamping puncak pada m/z 377 yang menunjukkan adanya ion prekursor vitamin B₂. Terdapat 2 puncak yang menunjukkan adanya 2 ion produk yang terjadi dan dapat dijelaskan dengan memperhatikan sifat kimia dari senyawa vitamin B₂. Riboflavin merupakan senyawa yang memiliki cincin isoalloksazin dan rantai samping ribitil. Dalam larutan asam atau netral, rantai samping ribitil akan terputus menghasilkan lumikrom yang mempunyai berat molekul 242,237 dan ion produk ribitil. Ion produk lumikrom diidentifikasi pada nilai m/z 243 dan digunakan sebagai dasar utama penentuan identitas dari ion prekursor vitamin B₂. Pola fragmentasi yang

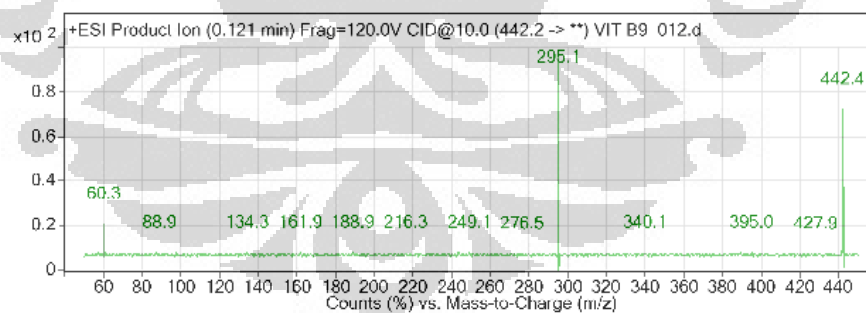
terjadi dari molekul ion prekursor menjadi ion produk pada vitamin B₂ terdapat pada Gambar 4.10 berikut :



Gambar 4.10. Proses fragmentasi vitamin B₂

Berdasarkan data spektrogram massa dan pola fragmentasi diatas dapat disimpulkan bahwa identifikasi ion prekursor vitamin B₂ pada m/z 377 didukung oleh adanya ion produk pada m/z 243. Ion produk pada m/z 243 mempunyai respon relatif yang paling tinggi dari ion produk lainnya. Area atau Respon relatif ion produk pada m/z 243 dapat digunakan sebagai dasar penentuan kuantitatif dari vitamin B₂.

Untuk vitamin B₉ dilakukan strategi yang sama dengan vitamin B₁ dan B₂, dimana analit diberikan energi *collision* agar terjadi tumbukan dan fragmentasi sehingga dapat dideteksi oleh detektor dan menghasilkan ion produk. Spektrogram massa vitamin B₉ menunjukkan adanya puncak pada m/z 442 yang merupakan indikasi adanya ion prekursor vitamin B₉ yaitu molekul asam pteroil glutamat [C₁₉H₁₉N₇O₆] yang mempunyai berat molekul 442 dan ion produk pada m/z 295. Hasil spektrogram massa yang diperoleh adalah seperti terdapat dalam Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Spektrogram massa fragmentasi vitamin B₉

Spektrogram massa vitamin B₉ yang diperoleh menggunakan MRM menunjukkan munculnya puncak pada m/z 442,4 dan 295 dimana puncak pada m/z 442,4 adalah ion prekursor vitamin B₉ dan puncak pada m/z 295 adalah ion produk. Ion produk terjadi karena adanya pemutusan ikatan rantai samping sehingga menghasilkan pterin-6-karboksilat dan asam p-amino benzoat asam

glutamat. Ion produk pada m/z 295 diidentifikasi sebagai asam p-amino benzoat asam glutamat yang mempunyai berat molekul 294 dan terjadi protonasi menghasilkan ion produk dengan berat molekul 295. Vitamin B₉ merupakan senyawa heterosiklik yang memiliki struktur asam pteroat yang terkonjugasi dengan satu atau lebih L-glutamat yang dihubungkan melalui gugus karbonil. Pola fragmentasi yang terjadi dari molekul ion prekursor vitamin B₉ menjadi ion produk terdapat pada Gambar 4.12 berikut :



Gambar 4.12. Proses fragmentasi vitamin B₉

Berdasarkan data spektogram massa dan pola fragmentasi diatas dapat disimpulkan bahwa identifikasi ion prekursor vitamin B₉ pada m/z 442 didukung oleh adanya ion produk pada m/z 295. Ion produk pada m/z 243 mempunyai respon relatif yang paling tinggi dari ion produk lainnya. Area atau respon relatif ion produk pada m/z 295 dapat digunakan sebagai dasar penentuan kuantitatif dari vitamin B₂.

Berdasarkan spektogram massa yang diperoleh dan pola fragmentasi dari masing-masing senyawa vitamin dapat disimpulkan ion precursor dan ion produk vitamin B₁, B₂, B₉ adalah seperti pada Tabel 4.2 berikut.

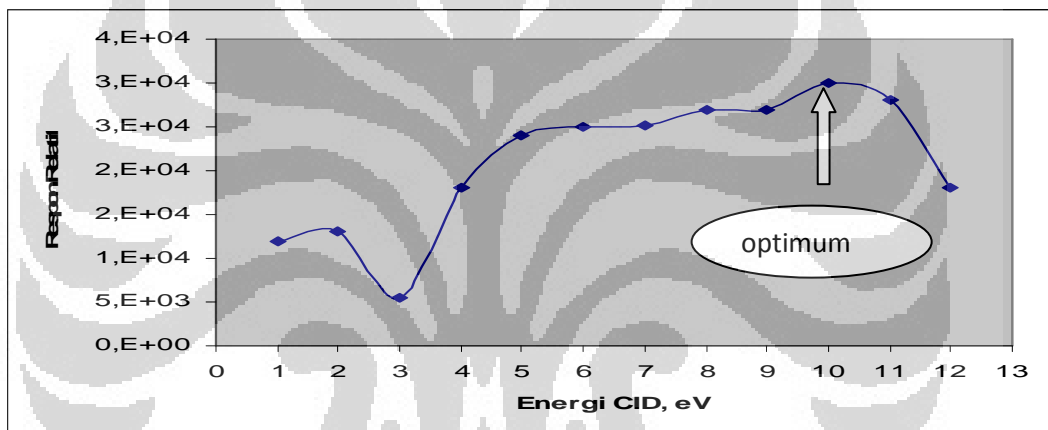
Tabel 4.2 Ion prekursor dan ion produk Vitamin B₁, B₂, B₉

Vitamin	Ion prekursor pada m/z	Ion produk pada m/z
B ₁	265	122
B ₂	377	243
B ₉	442	295

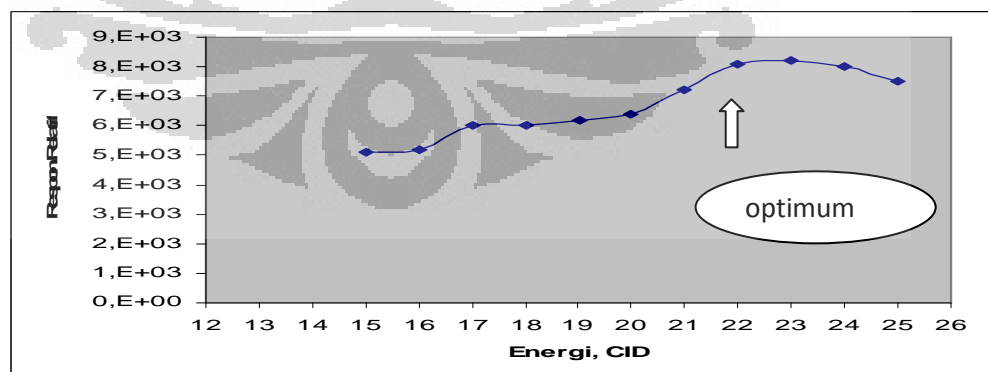
4.3 Optimasi energi *collision* ion prekursor vitamin B₁, B₂, B₉.

Energi *collision* atau *collision induced dissociation* yang disingkat CID adalah energi aktivasi yang diberikan kedalam *collision cell* untuk meningkatkan jumlah ion prekursor agar terjadinya fragmentasi secara optimal. Energi CID yang diberikan ditetapkan optimal bila relatif respon dari ion prekursor yang

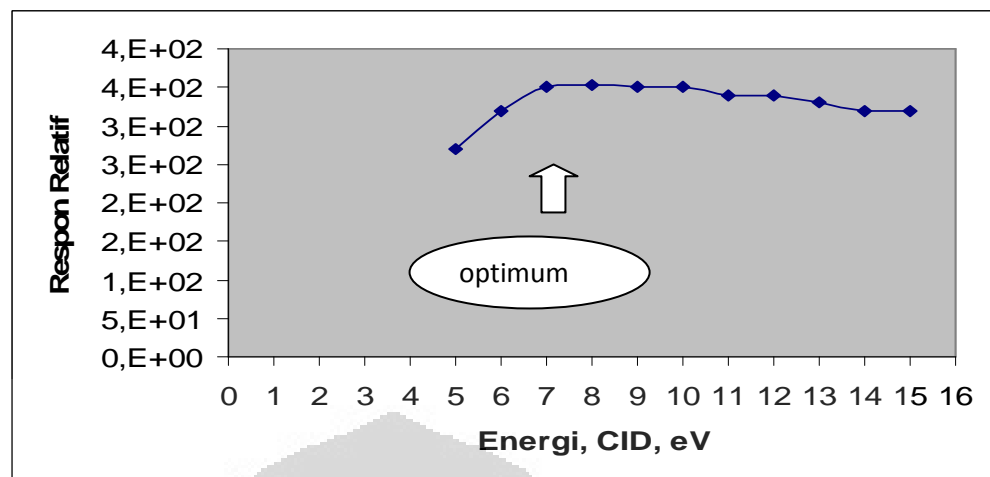
terdeteksi optimal. CID adalah salah satu tehnik yang digunakan untuk mengaktifkan ion dalam spektrometri massa. Energi CID yang diberikan pada tandem spektrometri massa adalah low energy *collision* berkisar antara 1 sampai 100 eV. Optimasi dilakukan dengan membuat variasi energi CID sehingga diperoleh respon relatif yang paling optimal. Untuk mengidentifikasi nilai optimal dibuat grafik antara energi CID sebagai sumbu x dan respon relatif ion prekursor masing-masing vitamin sebagai sumbu y. Spektrogram massa optimasi energi CID dari masing-masing vitamin terdapat dalam lampiran 1 sampai 3. Hasil optimasi masing-masing vitamin dapat dilihat pada Gambar 4.13 - 4.15 berikut .



Gambar 4.13. Grafik energi CID vs relatif respon ion prekursor vitamin B₁ pada m/z 265



Gambar 4.14 Grafik energi CID vs relatif respon ion prekursor vitamin B₂ pada m/z 377



Gambar 4.15 Grafik energi CID vs relatif respon ion prekursor vitamin B₉ pada m/z 442

Berdasarkan hasil percobaan yang digambarkan pada grafik diatas masing-masing analit menunjukkan nilai optimum CID dan memberikan respon relatif optimal. Energi CID optimum untuk masing-masing ion prekursor vitamin terdapat dalam Tabel 4.3 berikut.

Tabel 4.3. Energi CID Optimal ion prekursor vitamin B₁, B₂, B₉

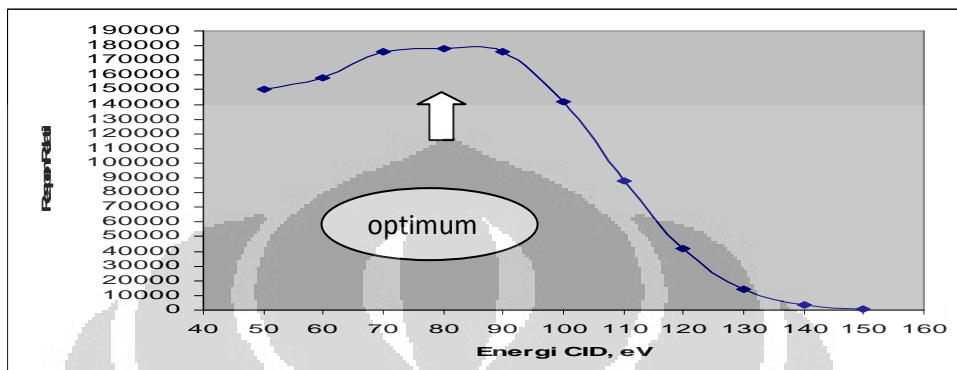
Vitamin	ion prekursor	Energi CID Optimal, eV
B ₁	265	10
B ₂	377	23
B ₉	442	8

Energi CID yang diperlukan agar diperoleh relatif respon ion prekursor masing-masing vitamin B₁, B₂, B₉ secara optimum sesuai Tabel 4.3 diatas menunjukkan urutan energi CID B₂ > B₁ > B₉. Hal ini menunjukkan bahwa energi *collision* yang harus diberikan agar diperoleh jumlah ion precursor yang optimal adalah pada senyawa vitamin B₂ karena mempunyai energi potensial yang lebih kecil dibandingkan dengan senyawa lainnya.

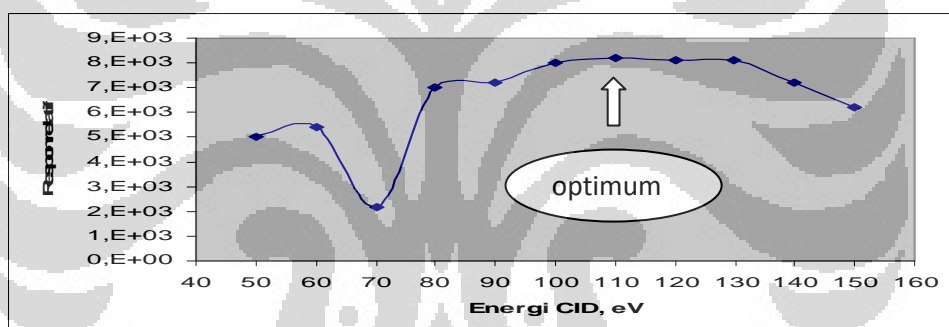
4.4 Optimasi energi pembentukan ion produk vitamin B₁, B₂, B₉.

Untuk memperoleh jumlah ion produk yang optimum maka ke dalam *collision cell* diberikan energi agar terjadi tumbukan sehingga terjadi fragmentasi

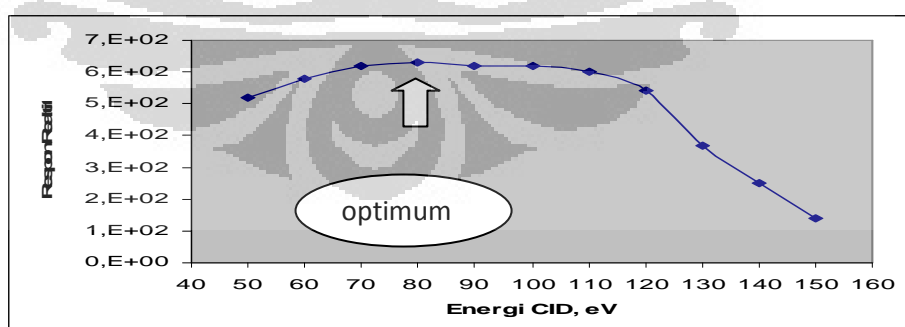
yang menghasilkan ion produk. Variasi energi CID diberikan dengan kenaikan 10 eV. Berdasarkan hasil percobaan diperoleh nilai respon relatif optimal pada masing masing vitamin dan dibuat grafik antara energi CID sebagai sumbu x dan respon relatif sebagai sumbu y. Kurva antara energi CID yang diberikan dengan respon relatif masing-masing terdapat pada Gambar 4.16 – 4.18 berikut



Gambar 4.16 Grafik energi CID vs relatif respon ion produk vit B₁ m/z 122



Gambar 4.17 Grafik energi CID vs relatif respon ion produk vit B₂ m/z 243



Gambar 4.18 Grafik energi CID vs relatif respon ion produk vit B₉ m/z 295

Berdasarkan hasil percobaan dengan menggunakan variasi energi diperoleh spektrogram massa seperti terdapat dalam lampiran 4 - 6. Respon relatif

ion produk yang diperoleh pada masing-masing vitamin terdapat pada Gambar 4.16 – 4.18 diatas yang menunjukkan nilai respon optimum energi *collision* seperti terdapat dalam Tabel 4.4 berikut.

Tabel 4.4 Energi CID Optimal ion produk vitamin B₁, B₂, B₉.

Vitamin	Ion produk	Energi <i>Collision</i> Optimal, eV
ion produk B ₁	122	80
ion produk B ₂	243	110
ion produk B ₉	295	80

Energi yang diperlukan untuk optimasi ion produk pada vitamin B₁, B₂, B₉, seperti terdapat dalam Tabel 4.4 diatas menunjukkan bahwa energi yang paling besar adalah untuk vitamin B₂. Hal ini disebabkan karena pada vitamin B₂ terjadi pemutusan ikatan pada ion prekursor menjadi ion produk diperlukan energi yang lebih besar. Ikatan yang diputus pada fragmentasi vitamin B₂ adalah ikatan antara metilen dengan nitrogen dimana seluruh elektronnya sudah terpakai untuk berikatan sehingga diperlukan energi yang lebih besar. Sementara untuk vitamin B₁, B₉ ikatan yang diputus adalah ikatan antara metilen dengan nitrogen yang masih memiliki sepasang elektron bebas dan merupakan nukleofil yang membantu fragmentasi.

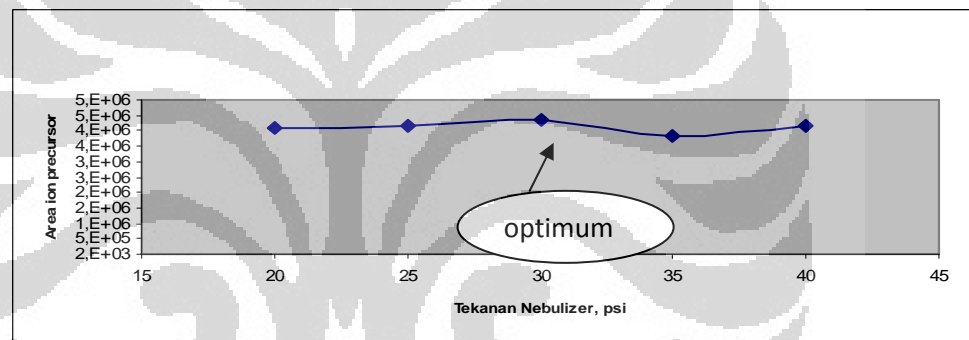
4.5 Optimasi kondisi ionisasi masing-masing vitamin B₁, B₂, B₉.

Untuk memperoleh relatif respon yang optimal pada saat terjadinya ionisasi maka diperlukan optimasi kondisi pada *elektrospray* yang mencakup optimasi tekanan *nebulizer*, laju alir gas dan temperatur gas. Untuk optimasi ini dilakukan variasi penurunan dan peningkatan dari yang ditetapkan oleh manual alat. Untuk tekanan nebulizer variasi pada 20, 25, 30, 35, 49 psi dengan nilai optimal yang ditetapkan oleh manual alat adalah 30 psi, laju alir gas argon untuk desolvasi dilakukan variasi 8, 9, 10, 11 psi dan temperatur gas *desolvasi* adalah berkisar 300 – 350 °C. Kondisi percobaan yang diperoleh dibuatkan kurva antara

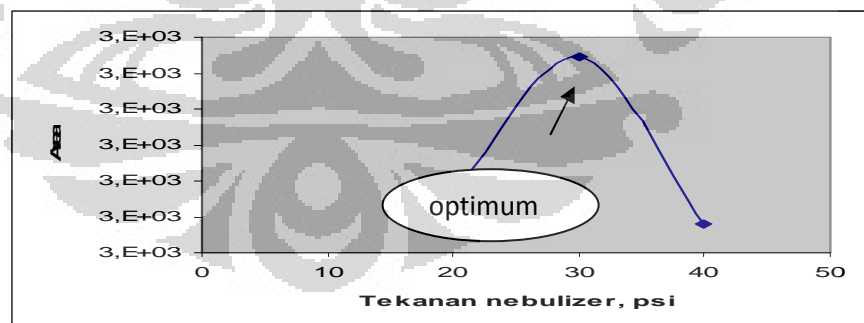
tekanan, laju alir dan temperatur versus area yang diperoleh dari ion prekursor, sehingga diperoleh nilai yang optimal.

4.5.1 Optimasi *nebulizer* untuk ionisasi vitamin B₁, B₂, B₉.

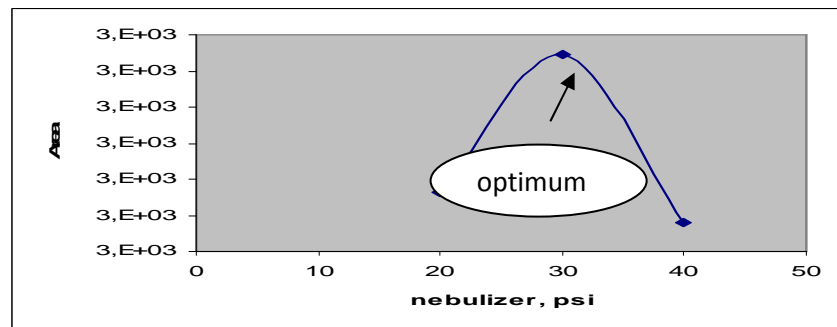
Nebulizer adalah gas pada *capillary interface* antara kromatografi cair dengan chamber ionisasi yang membantu proses ionisasi molekul menjadi ion precursor. Untuk memperoleh ion prekursor yang optimal maka dilakukan variasi jumlah atau volume gas *nebulizer* yang diatur melalui variasi tekanan. Spektogram massa yang diperoleh pada optimasi *nebulizer* terdapat pada lampiran 7 – 9. Nilai respon relatif yang diperoleh terhadap tekanan *nebulizer* terdapat dalam Gambar 4.19 – 4.21 berikut.



Gambar 4.19 Grafik tekanan *nebulizer* vs relatif respon ion prekursor vit B₁



Gambar 4.20 Grafik tekanan *nebulizer* vs relatif respon ion prekursor vit B₂

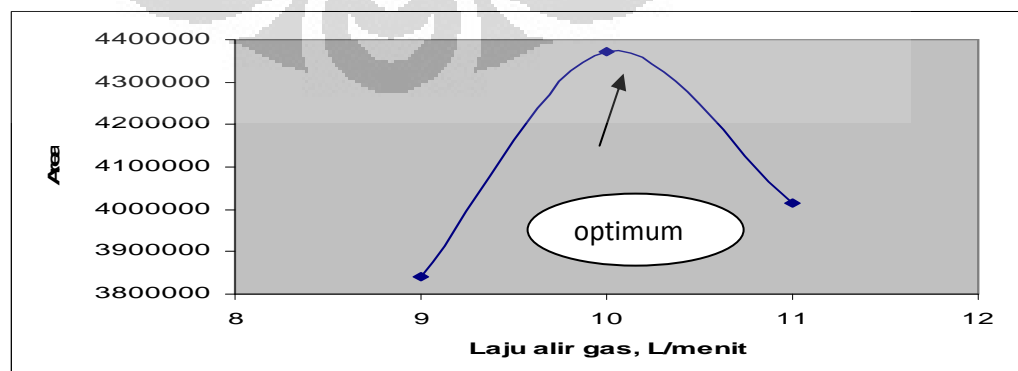


Gambar 4.21 Grafik tekanan nebulizer vs relatif respon ion prekursor vit B₉

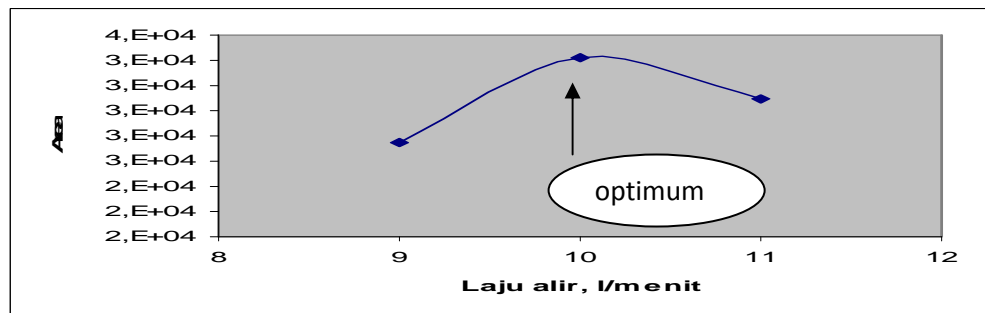
Berdasarkan data percobaan dan grafik pada gambar diatas diperoleh optimasi tekanan gas *nebulizer* untuk vitamin B₁, B₂, B₉ adalah pada tekanan 30 psi. Hal ini menunjukkan bahwa proses ionisasi tidak dipengaruhi oleh struktur molekul ion dan nilai optimal yang diperoleh adalah sama dengan nilai yang ditetapkan oleh manual alat.

4.5.2 Optimasi laju alir gas untuk ionisasi vitamin B₁, B₂, B₉.

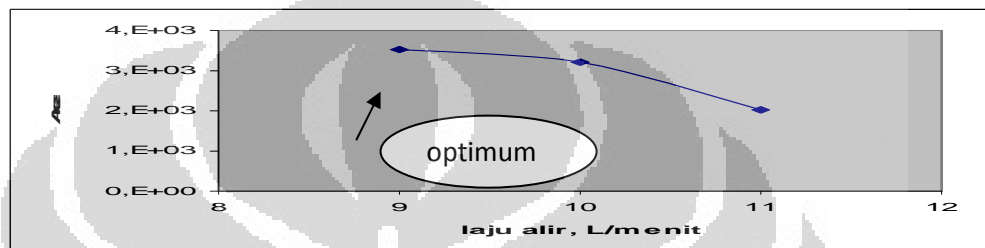
Gas yang dialirkan pada proses ionisasi adalah untuk membantu ion masuk ke *inteface analyzer* massa dan untuk membantu proses ionisasi molekul menjadi ion prekursor. Untuk memperoleh ion prekursor yang optimal maka dilakukan variasi laju alir gas argon dengan satuan L per menit. Spektogram massa yang diperoleh dari hasil variasi laju alir gas terdapat dalam lampiran. Nilai respon relatif yang diperoleh terdapat dalam Gambar 4.22 – 4.24 berikut.



Gambar 4.22 Grafik variasi laju alir vs relatif respon ion prekursor vit B₁



Gambar 4.23 Grafik variasi laju alir vs relatif respon ion prekursor vit B₂



Gambar 4.24 Grafik variasi laju alir vs relatif respon ion prekursor vit B₉

Berdasarkan data percobaan dan grafik pada gambar diatas diperoleh optimasi laju alir gas untuk vitamin B₁, B₂, B₉ adalah pada tekanan 9 – 10 L/menit Hal ini menunjukkan bahwa proses ionisasi tidak dipengaruhi oleh struktur molekul ion dan nilai optimal yang diperoleh adalah sama dengan nilai yang ditetapkan oleh manual alat.

4.5.3 Optimasi temperatur gas untuk ionisasi vitamin B₁, B₂, B₉.

Percobaan optimasi temperatur lebih mendekati pada temperatur maksimum yang ditetapkan oleh manual alat yaitu pada temperatur 350⁰C. Percobaan dilakukan dengan menurunkan temperatur dan diamati apakah terjadi peningkatan atau penurunan respon relatif ion precursor. Hasil percobaan menunjukkan bahwa penurunan temperatur tidak menyebabkan kenaikan respon relatif dari ion prekursor dan malah terjadi penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa temperatur sudah optimal pada nilai yang ditetapkan oleh manual alat. Hasil spektogram massa yang diperoleh terdapat dalam Lampiran 13.

4.5.4 Kondisi Optimasi campuran untuk ionisasi vitamin B₁, B₂, B₉.

Berdasarkan data percobaan diatas ditetapkan nilai m/z untuk identifikasi ion prekursor, ion produk dan kondisi optimum proses ionisasi dan fragmentasi masing-masing parameter untuk campuran vitamin B₁, B₂, B₉ sebagaimana terdapat dalam Tabel 4.5 berikut :

Tabel 4.5 Identifikasi dan kondisi optimal ionisasi, fragmentasi vitamin B₁, B₂, B₉

Parameter	Vitamin B ₁ ,	Vitamin B ₂ ,	Vitamin B ₉
Ion Prekursor, m/z	265	377	442
Ion produk, m/z	122	243	295
Energi CID ion prekursor, eV	10	23	8
Energi CID ion produk, eV	80	110	80
Tekanan nebulizer, psi	30	30	30
Laju alir gas ionisasi, L/menit	10	10	10
Temperatur gas,	350 ⁰ C	350 ⁰ C	350 ⁰ C

Parameter kondisi pengukuran lainnya yang tidak dilakukan optimasi maka digunakan kondisi yang ditetapkan dalam manual alat. Energi CID yang ditetapkan untuk pengukuran campuran vitamin B₁, B₂ dan B₉ dipilih energi tertinggi yang diperlukan diantara ke 3 vitamin tersebut.

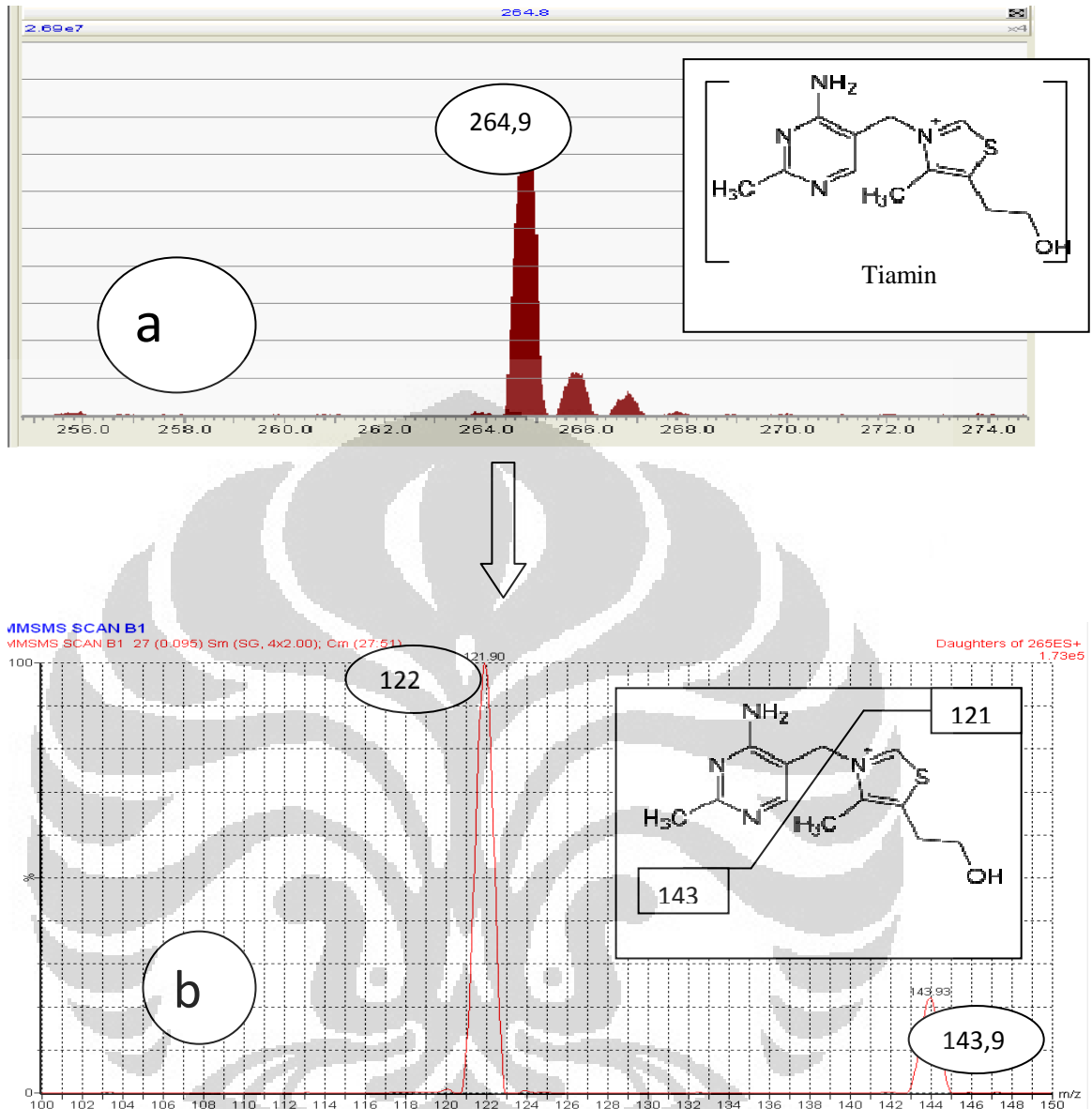
4.6 Identifikasi ion prekursor dan ion produk dengan alat water acquity TQD

Untuk memastikan bahwa ionisasi dan fragmentasi yang dioptimasi dengan alat LC-MS/MS Agilent 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (QQQ) pada sub.bab 4.1 maka dilakukan identifikasi menggunakan alat yang berbeda. Identifikasi menggunakan ms-scan untuk memperoleh informasi nilai m/z ion prekursor masing-masing vitamin. Optimasi signal m/z diperoleh melalui

variasi voltase cone, capillary voltase(kV) dan temperatur ($^{\circ}\text{C}$) sumber ion yang equivalent dengan alat merk agilent. Kondisi optimasi dipertahankan stabil hingga diperoleh respon optimal pada puncak spektrogram massa masing-masing vitamin. Kondisi optimal ms-scan dilakukan langsung pada rentang massa molekul yang mendekati nilai hasil identifikasi dengan alat Agilent dan diperoleh spektrogram massa dengan kondisi optimal yang merupakan karakter dari masing-masing vitamin. Untuk memastikan bahwa karakteristik m/z yang diperoleh dari *ms-scan*, adalah spesifik dari senyawa yang diduga maka puncak yang diperoleh pada m/z tersebut dilakukan ms-ms-scan untuk memberikan bukti dan keyakinan bahwa ion produk yang diperoleh merupakan fragmentasi dari ion prekursor. Data yang diperoleh dari *ms-ms-scan* adalah ion produk dari ion prekursor dan merupakan karakteristik dari senyawa tersebut. Data fragmentasi ini juga dibandingkan dengan berbagai referensi dan penelitian sejenis yang dapat mendukung argumentasi pembuktian senyawa yang bersangkutan.

4.6.1 Identifikasi ion prekursor dan ion produk vitamin B₁

Identifikasi ion prekursor vitamin B₁ dilakukan menggunakan MS-Scan pada posisi MS-1 On dan MS-2 Off, pada rentang massa molekul 256 sampai 274 agar dapat mengamati lebih baik komponen puncak vitamin B₁ dengan bobot molekul 265. Identifikasi ion produk vitamin B₁ dilakukan sistim MS-MS Scan pada rentang mendekati nilai m/z ion produk yang diperoleh sebelumnya. Hal ini dilakukan untuk meningkatkan sensitifitas dan mengurangi background atau noise sehingga massa molekul yang terdeteksi sudah spesifik pada m/z tertentu serta rasio signal dan noise semakin besar. Spektrum massa ion precursor dan ion produk yang diperoleh pada kondisi optimal dari vitamin B₁ terdapat pada Gambar 4.25.a dan 4.25.b.



Gambar 4.25 Spektogram massa, struktur molekul ion precursor (a) dan ion produk (b) vitamin B₁

Berdasarkan percobaan yang dilakukan dengan kondisi optimasi yang equivalent menggunakan alat waters diperoleh spektogram massa ion prekursor (Gambar 4.25.a) yang memiliki puncak pada m/z 265 yang spesifik untuk senyawa vitamin B₁. Nilai m/z ini identik dengan karakter dari ion molekul vitamin B₁ dengan massa molekul tiamin terprotonasi sebesar 265. Nilai m/z ini identik dengan yang diperoleh pada percobaan menggunakan alat Agilent yaitu puncak pada m/z 265 (Gambar. 4.1). Konfirmasi ini membuktikan bahwa ion

prekursor yang diperoleh pada ke dua alat tersebut adalah identitas molekul tiamin atau vitamin B₁.

Untuk memastikan bahwa ion molekul pada m/z 265 tersebut adalah tiamin dan tidak duplikasi dengan ion lainnya, dilakukan konfirmasi menggunakan scan ion produk untuk memperoleh gambaran fragmentasi dari tiamin. Ion produk dari ion prekursor adalah spesifik dan karakteristik serta diperoleh melalui kondisi optimalisasi ms-ms scan.

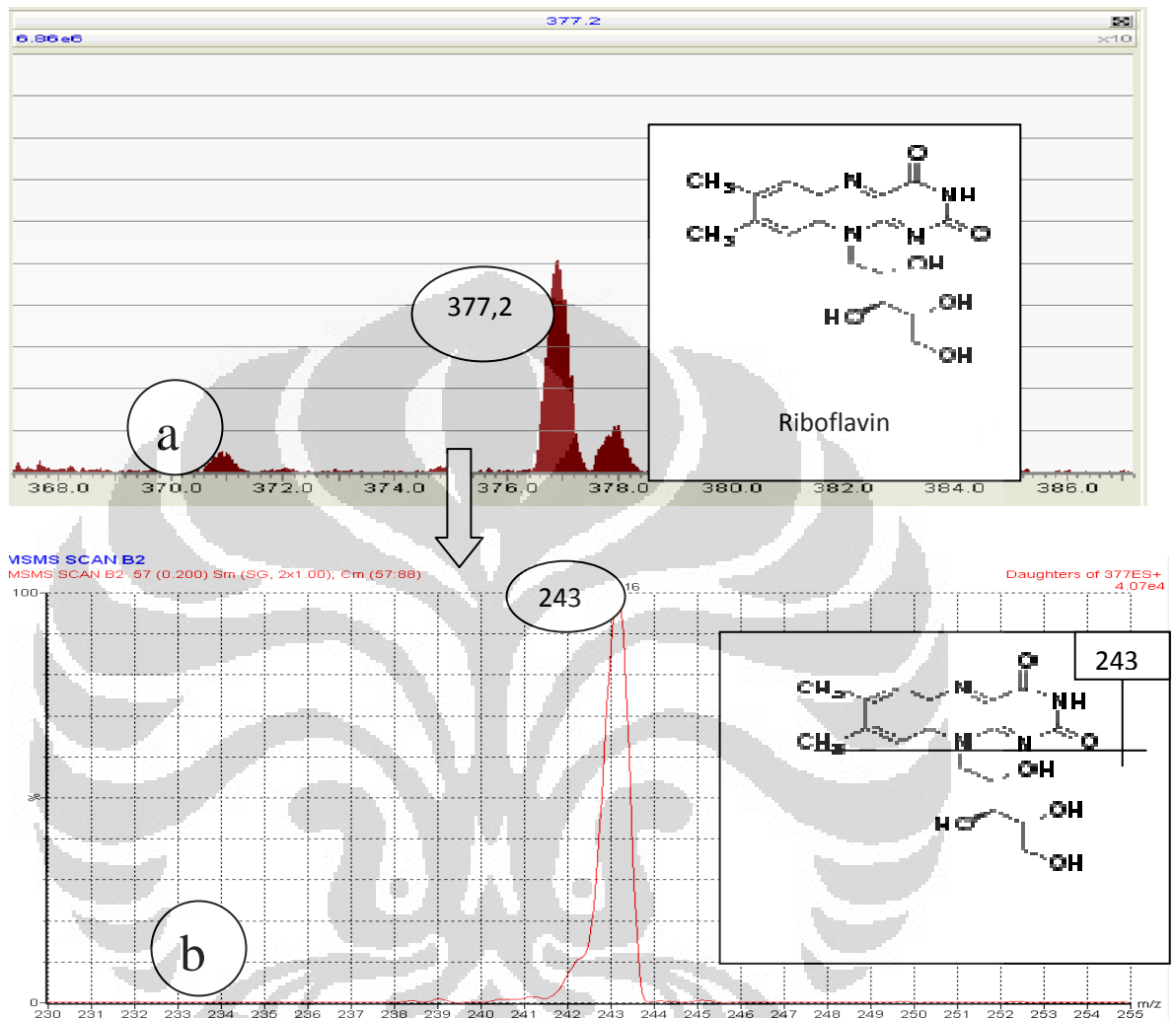
Data spektogram massa ion produk (gambar. 4.25.b) menunjukkan adanya puncak pada m/z 121,9 dan 143,9 dan dapat diidentifikasi sebagai ion produk pada m/z 121,9 dan m/z 143,9. Puncak pada m/z 265,5 [M]⁺ diidentifikasi sebagai ion prekursor dari Tiamine [C₁₂H₁₇N₄OS]⁺ yg mempunyai massa molekul 265,1116 g/mol. Ion prekursor ini terfragmentasi melalui pemutusan rantai N atau jembatan metilen yang menghasilkan fragmen pirimidin dan tiazol. Ion produk pada m/z 143,9 diidentifikasi sebagai spesies cincin tiazol [C₃NSCH₃C₂H₄OH] dengan berat molekul 143,9778. Ion produk pada m/z 121,9 diidentifikasi sebagai spesies cincin pirimidin [CH₃N₂C₄H₂NH₂] yang mempunyai berat molekul 121,0168. Karakteristik puncak spektogram massa pada m/z 265, m/z 143,9 m/z 121,9 menunjukkan bahwa kondisi fragmentasi yang diperoleh identik dengan fragmentasi molekul Tiamin dan dapat digunakan untuk memastikan bahwa kondisi ini sangat spesifik untuk vitamin B₁.

Fragmentasi m/z 265 → 121 dapat digunakan sebagai bukti karakteristik dari Tiamin dan sebagai dasar untuk analisis kualitatif dan kuantitatif dari tiamin. Berdasarkan data diatas dan dibandingkan dengan beberapa referensi dari pabrik pembuat alat maka transisi tersebut adalah spesifik untuk Tiamin.

4.6.2 Identifikasi ion prekursor dan ion produk vitamin B₂

Identifikasi dan karakterisasi vitamin B₂ dilakukan dengan strategi yang sama dengan vitamin B₁. Scanning ion prekursor dilakukan dengan rentang massa molekul yang spesifik yaitu 368 - 388 dan ion produk pada rentang 230 – 255,

menggunakan MRM. Spektogram massa ion precursor dan ion produk yang diperoleh terdapat pada Gambar 4.26 a dan b berikut :



Gambar 4.26. Spektogram massa, struktur molekul ion precursor (a) dan ion produk (b) vitamin B₂

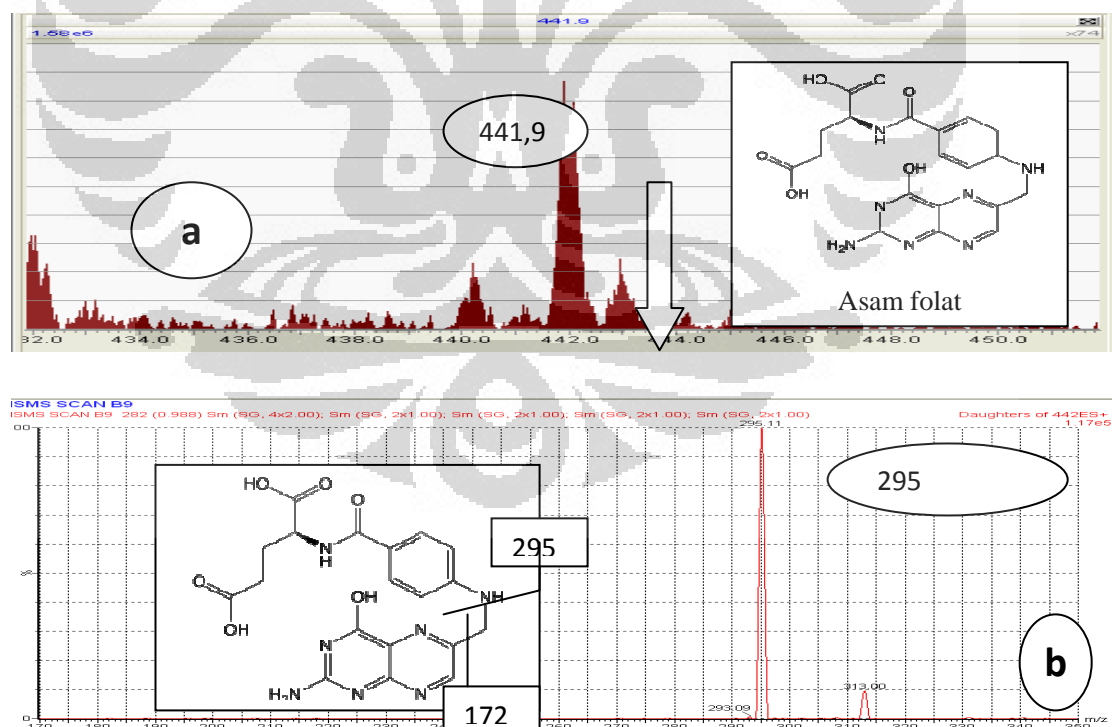
Spektogram massa ion prekursor (Gambar 4.26.a) diatas menunjukkan adanya respon optimal pada m/z 377,2 yang memberikan informasi bahwa m/z tersebut identik dengan massa molekul vitamin B₂. Nilai m/z pada 377 ini merupakan identitas dan karakter dari ion prekursor vitamin B₂ yang menunjukkan adanya protonasi dari ion molekul vitamin B₂.

Spektogram massa ion produk vitamin B₂ (Gambar 4.26. b) menunjukkan adanya puncak optimal pada. m/z 243,2. Puncak pada 377,3 [M+H]⁺ di

identifikasi sebagai ion prekursor dari vitamin B₂ [C₁₇H₂₀N₄O₆]⁺ yg mempunyai massa molekul 376,1377 g/mol. Fragmentasi ion prekursor terjadi melalui pemutusan rantai N, menghasilkan ion produk pada m/z 243,2 dan diidentifikasi sebagai spesies [C₁₂H₁₀N₄O₂] dengan berat molekul 243,03. Identifikasi dan karakterisasi dari puncak spektogram pada m/z 377,3 dan m/z 243,2 menunjukkan bahwa kondisi fragmentasi yang diperoleh identik dengan fragmentasi molekul vitamin B₂ dan digunakan untuk menyatakan identitas dan karakter vitamin B₂.

4.6.3 Identifikasi ion prekursor dan ion produk vitamin B₉

Identifikasi dan karakterisasi vitamin B₉ dilakukan menggunakan tahapan dan teknik yang sama dengan vitamin B₁ dan B₂. Scaning dilakukan pada nilai rentang m/z selektif yaitu 432 – 450 untuk ion prekursor dan 170 – 350 untuk ion produk. Spektogram massa ion precursor dan ion produk yang diperoleh terdapat dalam Gambar 4.27 .berikut :



Gambar 4.27. Spektogram massa, struktur molekul ion prekursor (a) dan ion produk (b) vitamin B₉

Berdasarkan spektrogram massa ion produk (Gambar 4.27a) diatas terdapat respon optimal pada m/z 441,9 yang memberikan karakter dan identitas dari ion prekursor vitamin B₉. Nilai m/z ini memberikan identifikasi identik dengan senyawa vitamin B₉ yang mempunyai massa molekul 441,11. Untuk memastikan m/z 441,9 tidak duplikat dengan ion lain dilakukan ms-ms scan dan diperoleh spektrum massa yang memberikan puncak pada m/z 295 (Gambar 4.27 b). Puncak ini diidentifikasi sebagai ion produk hasil pemutusan rantai N yang menghasilkan ion produk pada m/z 295,2 dan diidentifikasi sebagai spesies [C₁₂ H₁₂ N₄ O₆] dengan berat molekul 295,03. Identifikasi dan karakterisasi dari puncak spektrogram massa pada m/z 441,9 m/z 295,2 menunjukkan bahwa kondisi fragmentasi yang diperoleh identik dengan fragmentasi molekul asam folat dan dapat digunakan untuk melakukan pengukuran secara kuantitatif dan kualitatif vitamin B₉.

Identifikasi ion prekursor dan ion produk vitamin B₁, B₂, B₉ menggunakan alat Waters memberikan identitas dan karakteristik yang sama dengan hasil yang diperoleh menggunakan alat Agilent yaitu identitas ion prekursor pada m/z 265, 337, 442 dan ion produk pada m/z 122, 243, 295 untuk vitamin B₁, B₂, B₉ secara berurutan. Berdasarkan kondisi percobaan dan optimasi kondisi ionisasi, fragmentasi menggunakan 2 alat yang berbeda dapat disimpulkan bahwa identitas ion prekursor dan ion produk untuk penentuan vitamin B₁, B₂, B₉ secara simultan adalah sesuai Tabel 4.5.

4.7 Profil Kromatogram

Setelah diperoleh identitas dari ion prekursor dan ion produk serta kondisi optimal ionisasi, fragmentasi dilakukan injeksi melewati kolom kromatografi cair untuk mengetahui kemampuan pemisahan masing-masing vitamin. Kolom kromatografi yang dipilih berdasarkan merk dari masing-masing alat dan mempertimbangkan kepolaran dari vitamin yang akan dipisahkan. Fase diam merupakan faktor yang menentukan untuk pemisahan campuran senyawa termasuk vitamin B₁, B₂, B₉ secara simultan. Vitamin ini mempunyai sifat polar dapat dilakukan pemisahan dengan menggunakan kolom fase terbalik. Kolom jenis

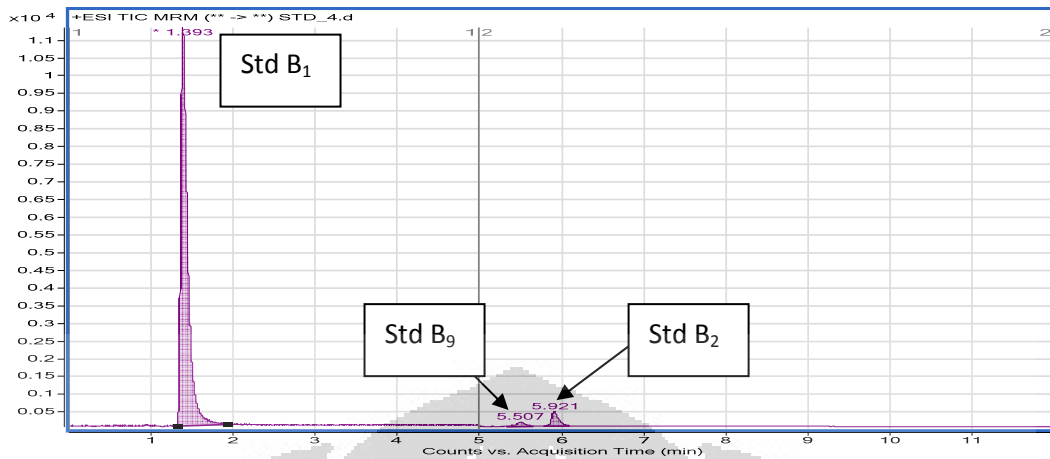
fase terbalik dipilih untuk mendapatkan kondisi pemisahan yang paling baik, meskipun pada deteksi dengan ms-ms tidak begitu signifikan pengaruhnya. Pemisahan dilakukan menggunakan kolom agilent Zorbax RRHT SB-Aq, waters aquity UPLC HSS T3 dan waters equity BEH C18 serta pelarut, kecepatan alir yang sama.

4.7.1 Profil kromatogram menggunakan alat LC-MS/MS agilent 6410 dan kolom agilent Zorbax RRHT SB-Aq.

Untuk mendapatkan profil kromatogram standar vitamin dilakukan Injeksi standar vitamin B₁, B₂, B₉ ke alat LC-MS-MS menggunakan fase gerak air dan metanol mengandung 20 mM amonium format dan 0,1 % asam asetat dengan volume injeksi 10 µL, kecepatan alir 5 ml/menit dan kondisi elusi gradient sesuai Tabel 4.6. Kromatogram standar vitamin B₁, B₂, B₉ yang diperoleh pada kondisi fase gerak ini seperti pada Gambar 4.28. Berdasarkan data kromatogram yang diperoleh terdapat pemisahan yang baik antara vitamin B₁ dan B₂ maupun antara B₂ dan B₉ serta diperoleh nilai resolusi masing-masing vitamin adalah $R > 1$.

Tabel 4.6 Kondisi elusi fase gerak menggunakan alat agilent

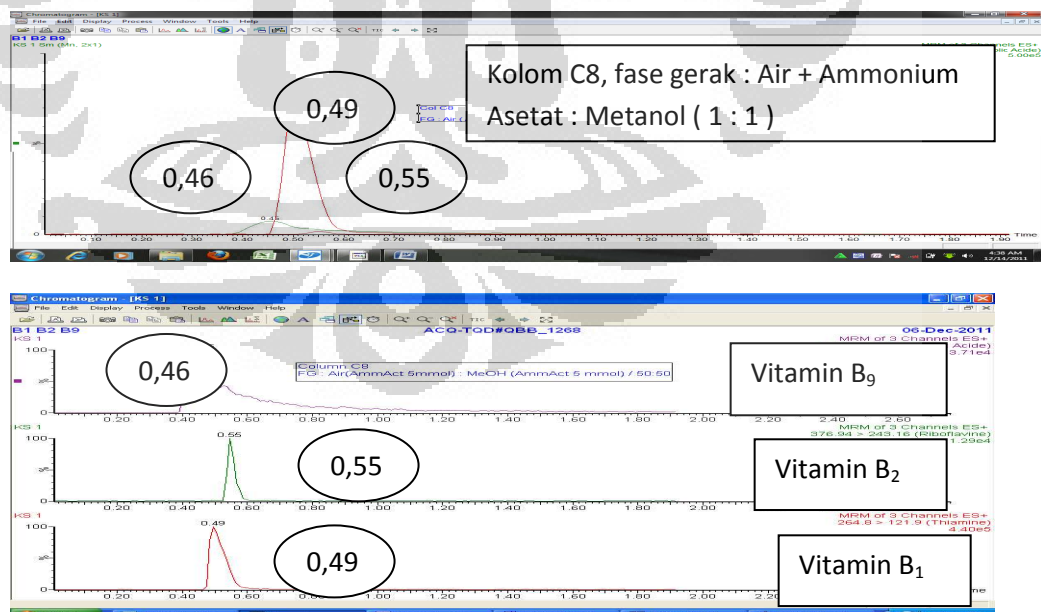
Waktu, menit	% A (Air mengandung 20 mM ammonium format dan 0,1 % asam format)	% B (Metanol mengandung 20 mM ammonium format dan 0,1 % asam format)
0,0	10	90
8,0	45	55
8,1	90	10



Gambar 4.28. Kromatogram standar vitamin B₁, B₂, B₉ dengan alat Agilent

4.7.2. Profil kromatogram menggunakan LC-MS/MS aquity UPLC Triple Quadrupole (TQD) dan kolom waters aquity BEH C₈

Pemisahan menggunakan kolom C₈ dengan komposisi fase gerak air yang mengandung ammonium asetat 5 mmol dengan metanol 1 : 1, diperoleh waktu retensi Vitamin B₁, 0,49, Vitamin B₂, 0,55 dan Vitamin B₉, 0,46 seperti terdapat pada Gambar 4.29.

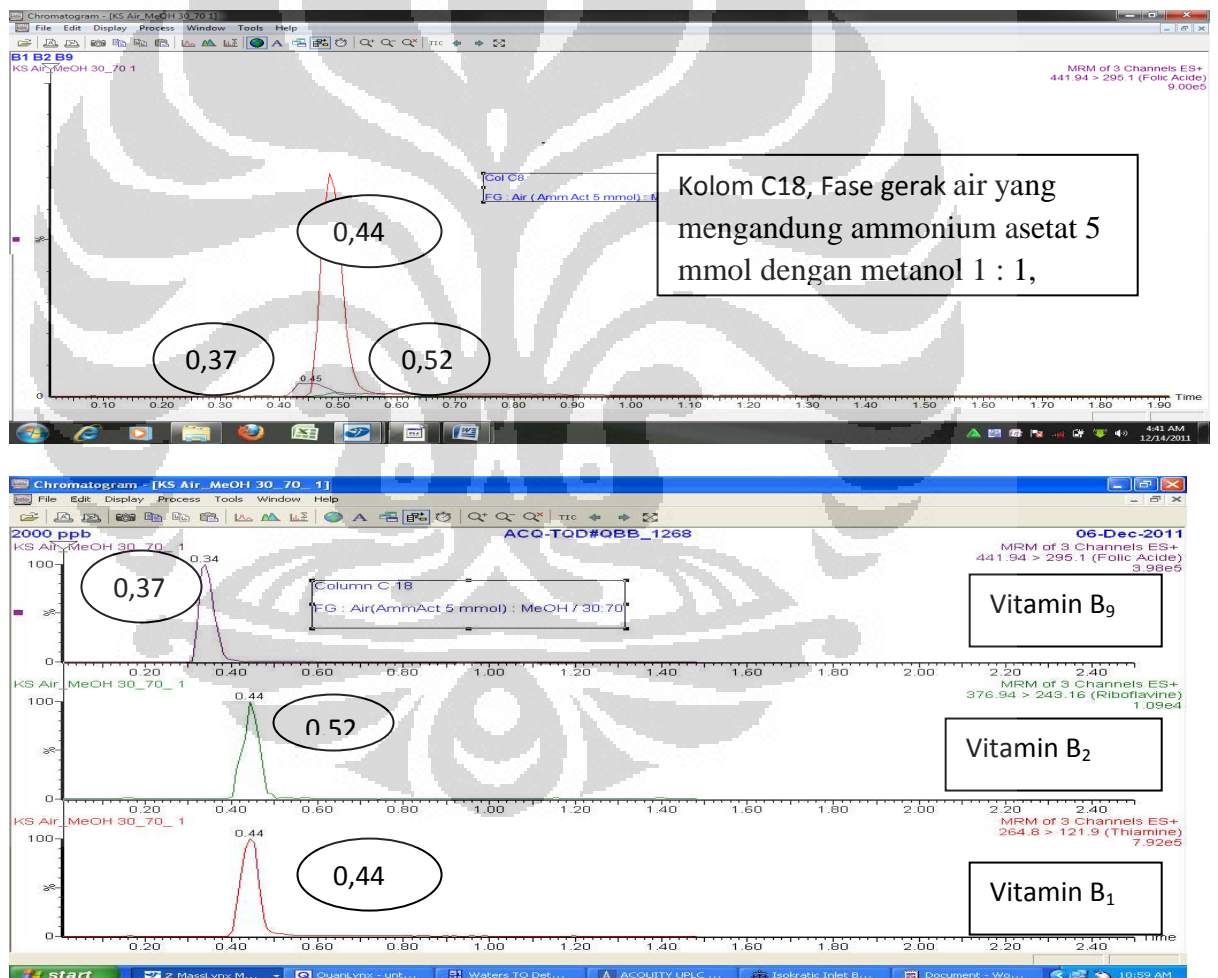


Gambar 4.29. Kromatogram standar vitamin B₁, B₂, B₉ menggunakan alat waters Aquity UPLC Triple Quadrupole (TQD) dan kolom Aquity BEH C₈

Pemisahan menggunakan kolom aquity BEH C8 seperti pada kromatogram diatas diperoleh puncak vitamin B₉ kurang baik yaitu munculnya tailing dan broadening, dan tidak mampu memisahkan dengan cukup baik , meskipun waktu retensinya cukup baik.

4.7.3. Profil kromatogram menggunakan LC-MS/MS waters aquity UPLC Triple Quadrupole (TQD) dan kolom waters Aquity BEH C₁₈

Pemisahan menggunakan kolom Aquity BEH C₁₈ dengan komposisi fase gerak air yang mengandung ammonium asetat 5 mmol dengan metanol 1 : 1, diperoleh waktu retensi vitamin B₁, 0,44 vitamin B₂, 0,52 dan vitamin B₉, 0,37 seperti terdapat pada Gambar 4.30 :

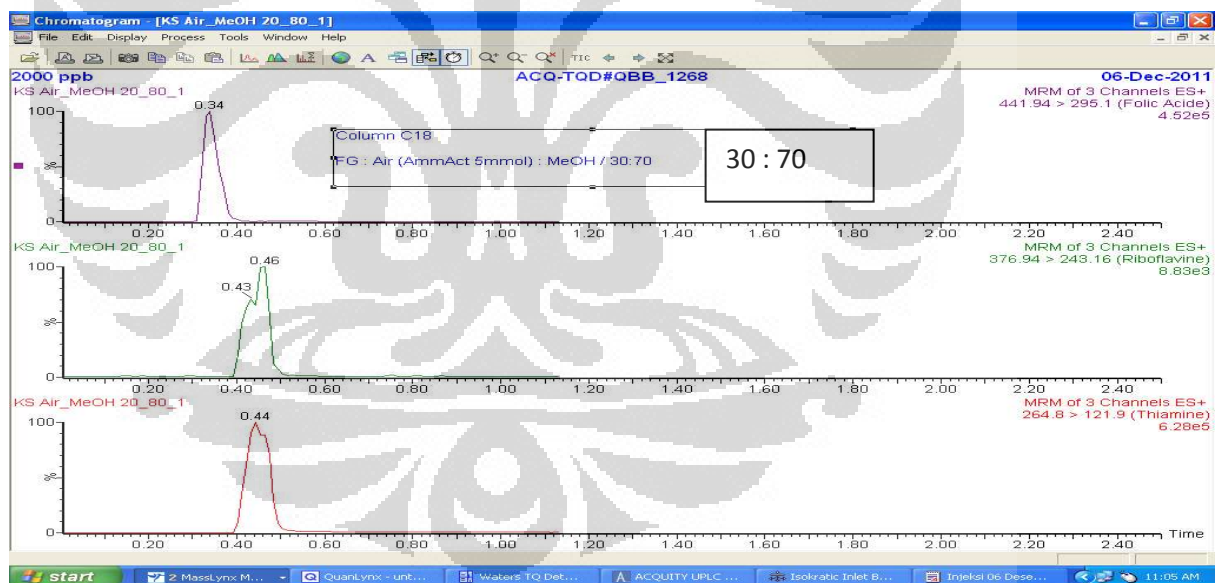


Gambar 4.30. Kromatogram standar vitamin B₁, B₂, B₉ menggunakan alat waters Aquity UPLC Triple Quadrupole (TQD) dan kolom Aquity BEH C₁₈.

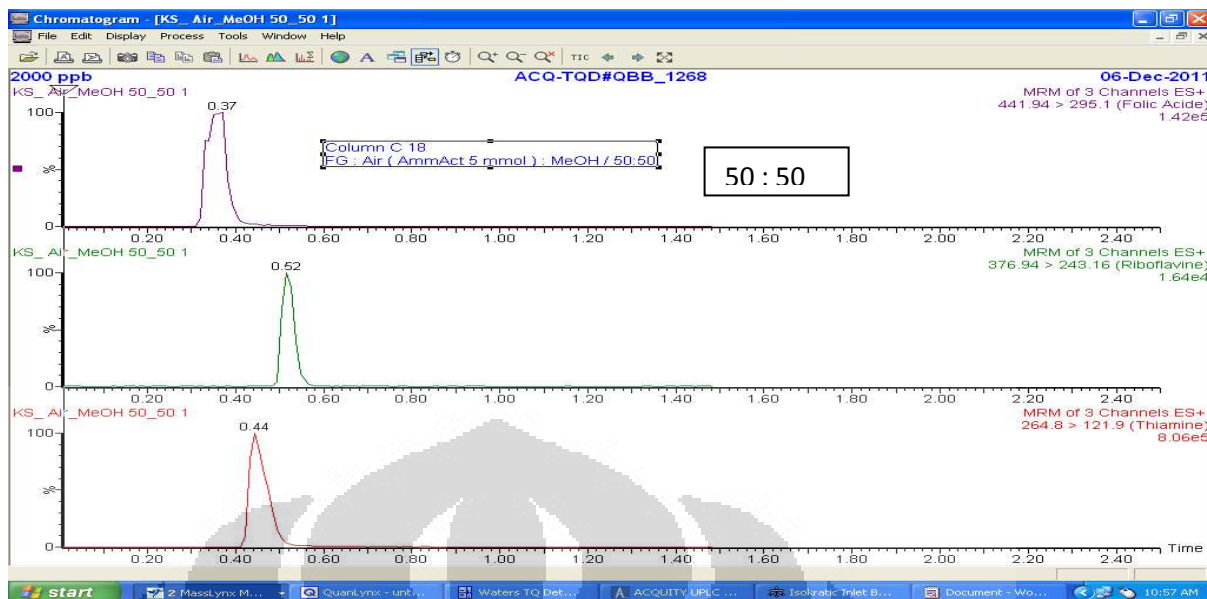
Berdasarkan data hasil percobaan, kromatogram yang diperoleh pemisahan vitamin B₁, B₂, B₉ dengan menggunakan kolom aquity BEH C₁₈ memberikan nilai resolusi yang lebih baik, namun masih terjadi sedikit pelebaran puncak khususnya pada vitamin B₂.

4.7.4 Optimasi kondisi elusi fase Gerak menggunakan alat waters aquity UPLC Triple Quadrupole (TQD) dan kolom aquity BEH C₁₈

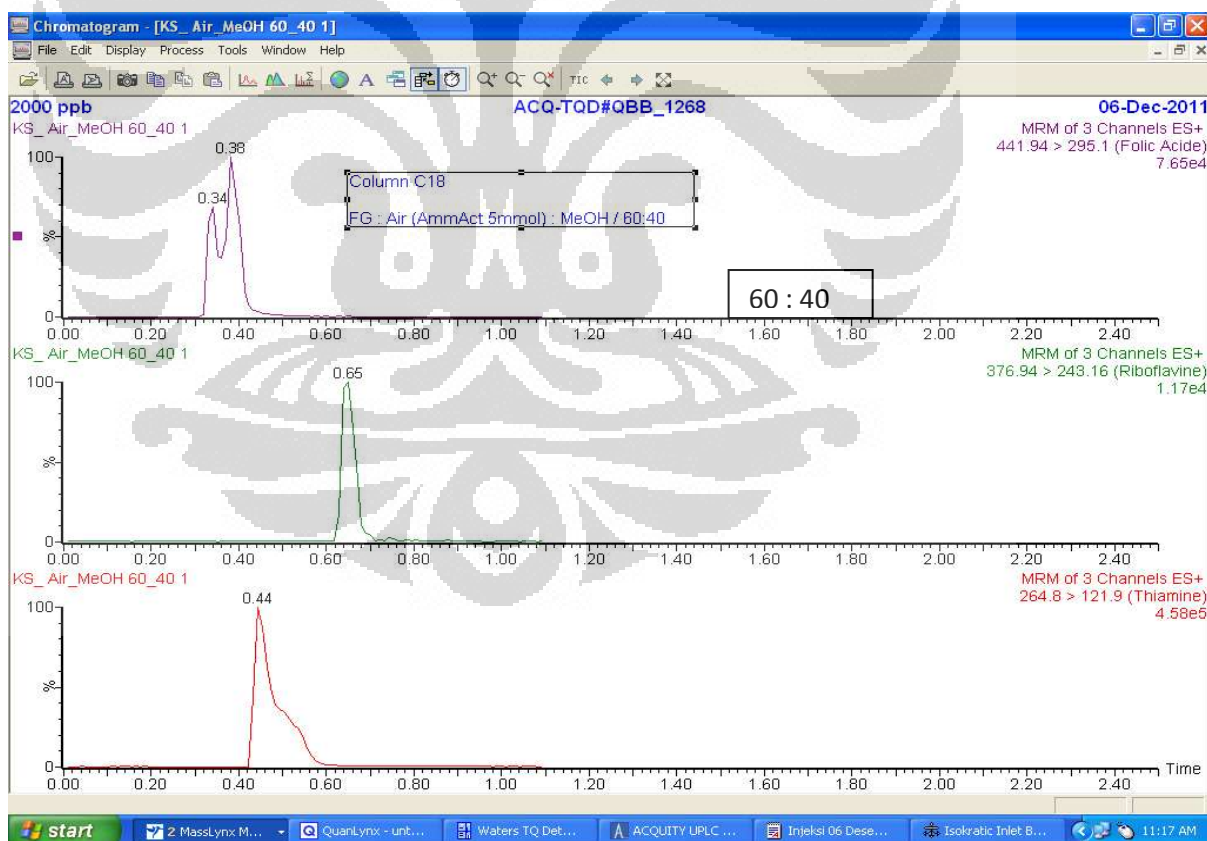
Untuk mengetahui kondisi elusi fase gerak yang paling optimal, maka dilakukan pemisahan dengan melakukan variasi komposisi larutan fase gerak sehingga diperoleh kondisi optimal berdasarkan waktu retensi yang paling baik untuk memisahkan komponen vitamin B₁, B₂, B₉. Variasi fase gerak larutan A (%) dan B (%) yang dilakukan 30 : 70, 50 : 50 dan 60 : 40 dengan kecepatan alir 0,3 µL per menit. Kromatogram massa yang diperoleh dengan menggunakan kondisi variasi fase gerak terdapat dalam Gambar 4.31, 4.32, 4.33



Gambar 4.31 Kromatogram standar vitamin B₁, B₂, B₉ dengan komposisi Fase gerak : 30 : 70 dan kolom aquity C₁₈



Gambar 4.32 Kromatogram standar vitamin B₁, B₂, B₉ dengan komposisi fase gerak : 50:50. dan kolom aquity C₁₈



Gambar 4.33 Kromatogram standar vitamin B₁, B₂, B₉ dengan komposisi fase gerak 60:40 dan kolom aquity C₁₈

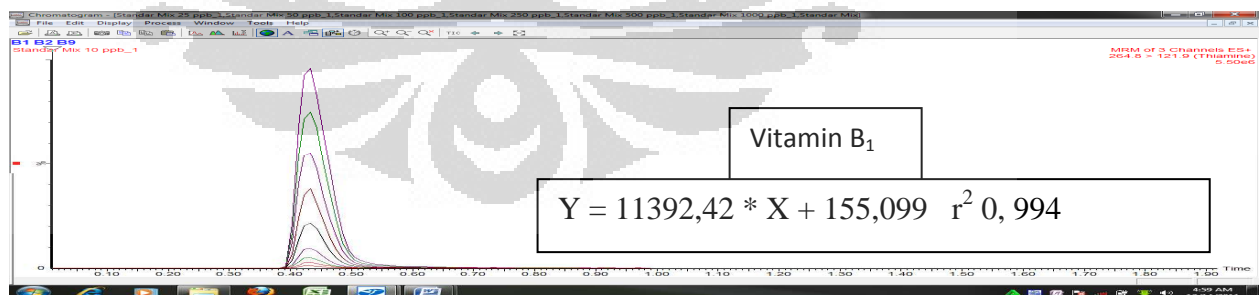
Berdasarkan data percobaan dan kromatogram yang diperoleh terlihat pemisahan standar B₁, B₂, B₉ yang cukup baik adalah pada komposisi fase gerak 50 : 50. dimana puncak masing-masing vitamin terpisah dengan cukup baik namun terjadi pelebaran puncak khususnya pada vitamin B₉.

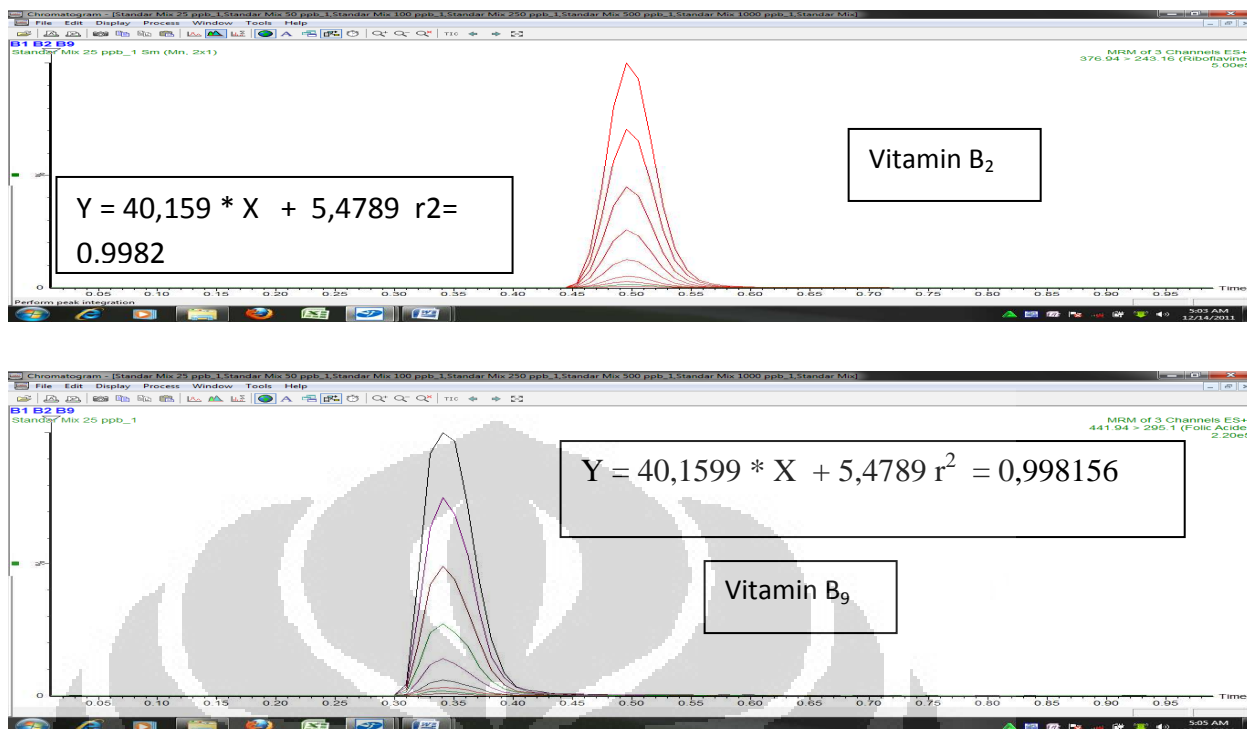
Setelah diperoleh kondisi Optimum untuk identifikasi dan karakterisasi masing-masing vitamin B₁, B₂, B₉ dengan menggunakan kolom, fase gerak dan komposisinya, maka dilakukan penentuan kinerja metoda.

4.8. Penentuan kinerja metoda

4.8.1 Penentuan Linearitas menggunakan alat waters dan alat agilent

Penentuan Linearitas dilakukan dengan melakukan injeksi deret standar Vitamin B₁, B₂, B₉ ke alat LC-MS/MS sehingga diperoleh respon masing-masing analit. Data respon digunakan untuk membuat kurva standar yang merupakan plot antara konsentrasi vitamin (sumbu x) dengan respon (sumbu y). Berdasarkan kurva standar masing-masing vitamin dihitung nilai koefisien korelasi masing-masing vitamin. Data respon, konsentrasi, masing-masing vitamin terdapat pada lampiran 14, 15 dan 16. Persamaan regresi, nilai r^2 dan puncak kromatogram masing-masing standar vitamin sebagaimana terdapat pada Gambar 4.34 berikut :





Gambar 4.34. Persamaan regresi, nilai r^2 dan puncak kromatogram masing-masing standar vitamin B₁, B₂, B₉

Berdasarkan percobaan dan perhitungan nilai koefisien korelasi kurva standar vitamin B₁, B₂, B₉ menggunakan alat waters diperoleh nilai yang cukup baik bila dibanding nilai standar yang dipersyaratkan yaitu 0,995.

Untuk penentuan linearitas menggunakan alat Agilent dilakukan menggunakan prinsip dan strategi yang sama dan diperoleh hasil yang cukup baik sebagaimana terdapat pada lampiran lampiran 17, 18 dan 19. Data kurva standar dan linearitas yang diperoleh digunakan untuk menghitung rentang ukur yang terbaik pada masing-masing vitamin. Nilai rentang masing-masing alat dan vitamin terdapat pada lampiran.

4.8.2 Penentuan Limit Deteksi

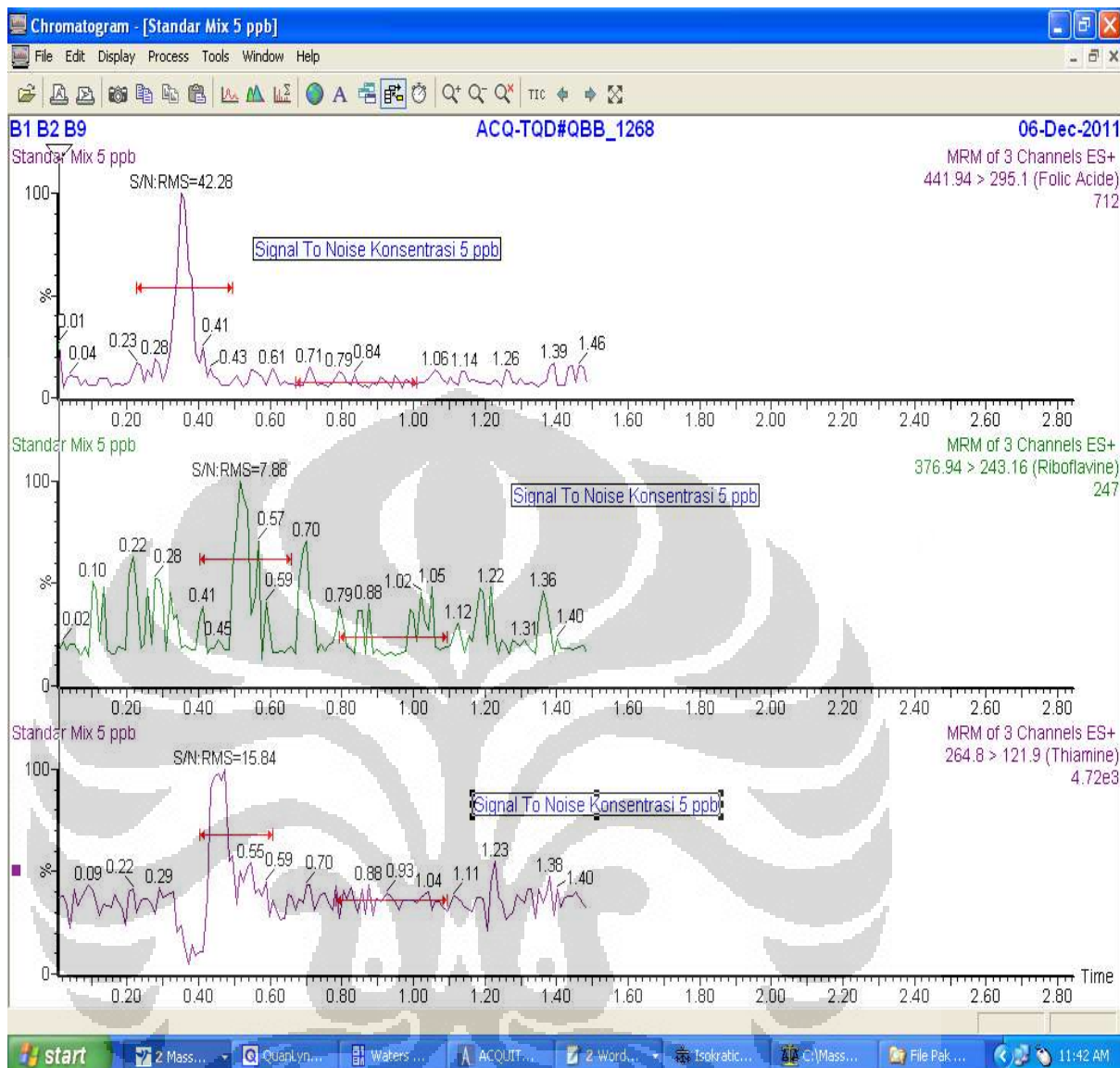
Penentuan limit deteksi dilakukan dengan menghitung rasio signal terhadap noise dan dikalikan dengan konsentrasi analit dengan rumus : $LOD = \text{Konsentrasi analit (ppb)} \times 3 (\text{Noise/Signal})$ dan $LOQ = \text{Konsentrasi analit (ppb)} \times 10 (\text{Noise/Signal})$. Limit deteksi dilakukan dengan injeksi standar terkecil yang

masih dapat diidentifikasi dan dihitung nilai LODnya. Nilai LOD yang diperoleh menggunakan alat waters adalah 0,3 µg/ml vitamin B₁, 1,9 µg/ml vitamin B₂, 0,9 µg/ml vitamin B₉. Nilai LOQ yang diperoleh menggunakan alat waters adalah 1,183 µg/ml vitamin B₁, 6,345 µg/ml vitamin B₂, 3,257 µg/ml vitamin B₉. Kromatogram yang diperoleh untuk penentuan limit deteksi menggunakan alat waters pada standar terkecil (5 µg/ml) masing-masing vitamin terdapat pada Gambar 4.35.

Nilai LOD dan LOQ menggunakan alat waters dapat dihitung melalui kurva standar dan diperoleh nilai LOD dan LOQ sebagaimana terdapat pada Tabel 4.7 berikut :

Tabel 4.7 Nilai LOD dan LOQ menggunakan perhitungan kurva standar

Analit	Vitamin B ₁	Vitamin B ₂	Vitamin B ₉
LOD = 3 S(y/x) /b (ppm)	2,713	3,121	2,693
LOQ = 10 S(y/x) /b(ppm)	9,043	10,404	8,977



Gambar 4.35 Kromatogram standar terkecil vitamin B₁, B₂, B₉ menggunakan alat waters

Limit Deteksi menggunakan alat agilent dihitung melalui rumus dari data kurva standar yang diperoleh. Nilai LOD dan LOQ yang diperoleh sebagaimana terdapat dalam lampiran 21.

4.8.3 Penentuan ketepatan metoda (akurasi)

Penentuan akurasi dilakukan menggunakan alat waters dengan kolom, fase gerak dan kondisi yang diperoleh pada percobaan sebelumnya. Penentuan akurasi hanya dilakukan untuk vitamin B₁ dengan melakukan analisa Certified Reference material (CRM) BCR 121 sebanyak duplikat, dengan nilai benar vitamin B₁ pada CRM adalah 4,65 ppm. Nilai vitamin B₁ yang diperoleh berdasarkan percobaan adalah sebagaimana terdapat pada Tabel 4.8 berikut :

Tabel 4.8. Hasil pengukuran, nilai acuan dan akurasi vitamin B₁

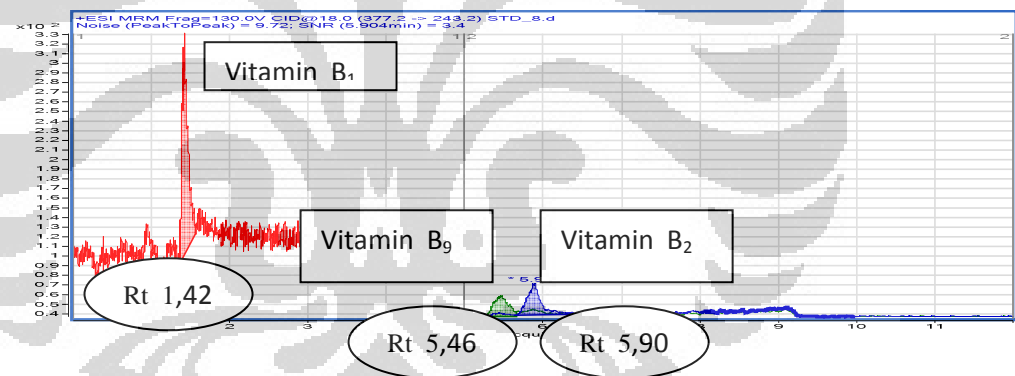
Analit	Ulangan I (ppm)	Ulangan II (ppm)
Vitamin B1	4,532	4,132
Nilai acuan CRM (ppm)	4,65	4,65
Akurasi (%)	96,64	88,09

Berdasarkan data diatas dinyatakan bahwa nilai akurasi yang diperoleh untuk vitamin B₁, adalah cukup baik bila dibandingkan dengan persyaratan 85 – 115 % (Horwitz,AOAC).

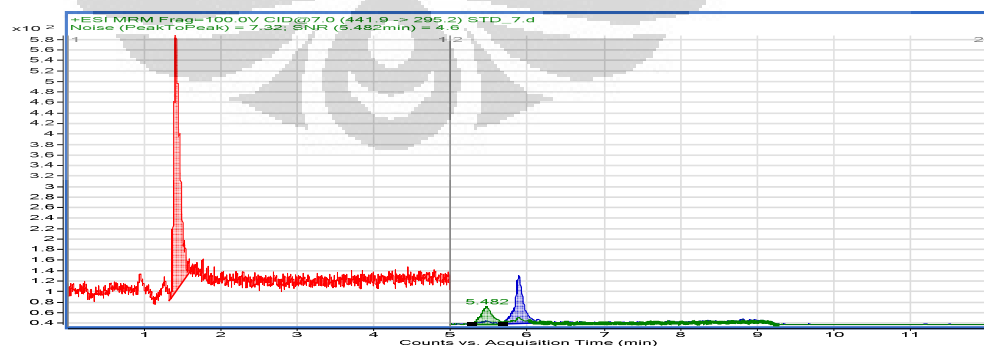
4.9. Pengukuran sampel.

Berdasarkan data optimasi kondisi kromatografi dengan detektor tandem spektrometri massa dan dilakukan pengujian sampel matriks tepung terigu yang disampling pada berbagai kota di Indonesia. Pengukuran sampel dilakukan menggunakan alat agilent dengan strategi, pola fragmentasi, kolom, fase gerak, kondisi optimum yang sama. Perhitungan nilai sampel dilakukan berdasarkan respon dari analit kondisi m/z yang spesifik untuk masing-masing vitamin menggunakan alat agilent. Nilai kadar vitamin dihitung melalui perbandingan dengan kurva standar yang diperoleh menggunakan alat dan kondisi yang sama.

Contoh kromatogram standar vitamin B₁, B₂, B₉ yang diperoleh seperti terlihat dalam Gambar 4.36 dan contoh kromatogram sampel pada Gambar 4.37. Kromatogram lengkap sampel terdapat pada lampiran 23. Kromatogram sampel menunjukkan nilai waktu retensi yang identik dengan waktu retensi standar masing-masing vitamin dan memiliki nilai m/z identik antara sampel dengan m/z standar untuk masing-masing ion prekursor maupun ion produk yaitu vitamin B₁ pada m/z 265, 122, vitamin B₂ pada m/z 377, 243, dan vitamin B₉ pada m/z 442, 295. Nilai respon hasil pengujian sampel dibandingkan dengan nilai respon standar melalui kurva linearitas menggunakan alat agilent dan diperoleh nilai kandungan vitamin B₁, B₂, B₉ pada matriks sampel tepung terigu. Nilai Respon pada sampel yang dianggap positif sebagai sinyal adalah yang mempunyai S/N diatas 3 untuk membedakan sinyal sampel dari noise. Hasil pengujian terhadap berbagai jenis tepung terigu baik impor maupun lokal yang dilakukan diberbagai kota terdapat dalam Lampiran 24.



Gambar 4.36. Kromatogram standar vitamin B₁, B₂, B₉



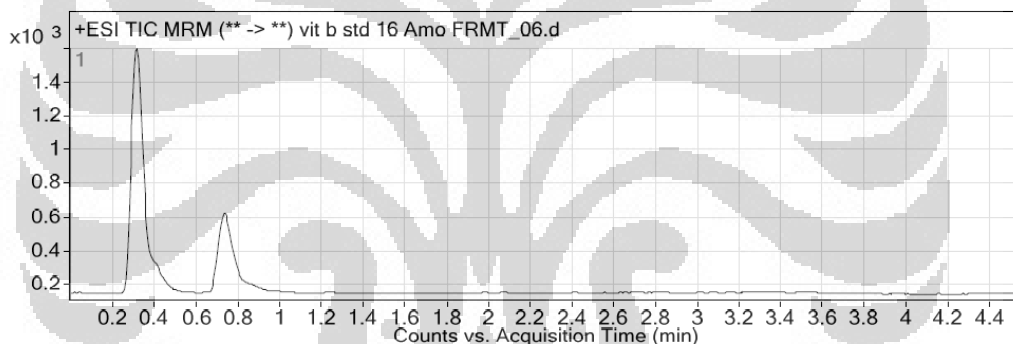
Gambar 4.37. Kromatogram sampel vitamin B₁, B₂, B₉

4.10. Pemisahan menggunakan alat agilent dan kolom waters Acquity HSS T3.

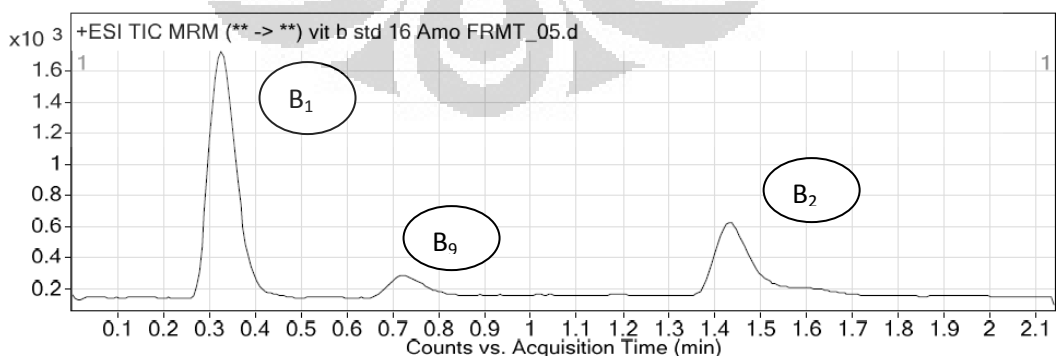
Memperhatikan hasil kromatogram standar vitamin menggunakan kolom C_{18} pada gambar 4.32 sub. bab. 4.7.4 yang menunjukkan bahwa puncak standar vitamin B_9 menggunakan kolom acquity C_{18} terjadi pemecahan puncak atau puncak yang diperoleh tidak optimal.

Untuk mengatasi hal tersebut dilakukan pengukuran dengan menggunakan kolom acquity HSS T3 yang mempunyai sifat lebih polar dari kolom C_{18} dan memang di disain untuk digunakan pada pengujian senyawa vitamin yang larut dalam air.

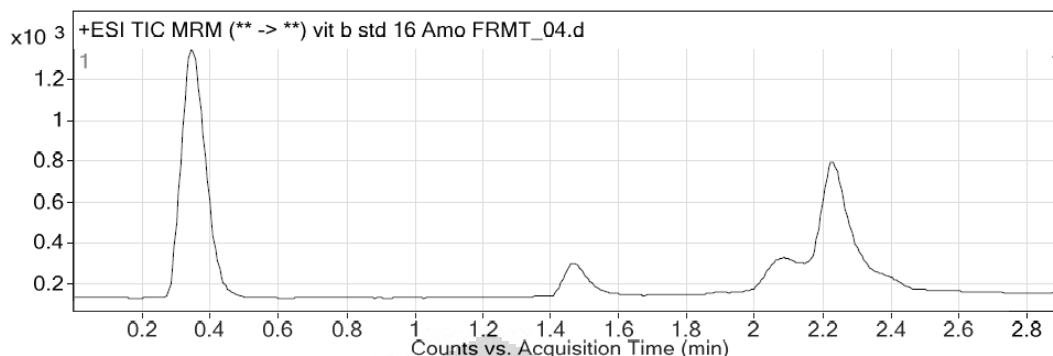
Hasil injeksi standar vitamin menggunakan kolom Acquity HSS T3 dengan fase gerak yang sama saat dengan kolom agilent Zorbax SB Aq dan variasi komposisi fase gerak diperoleh data kromatogram sebagaimana terdapat dalam Gambar 4.38 – 4.42 berikut :



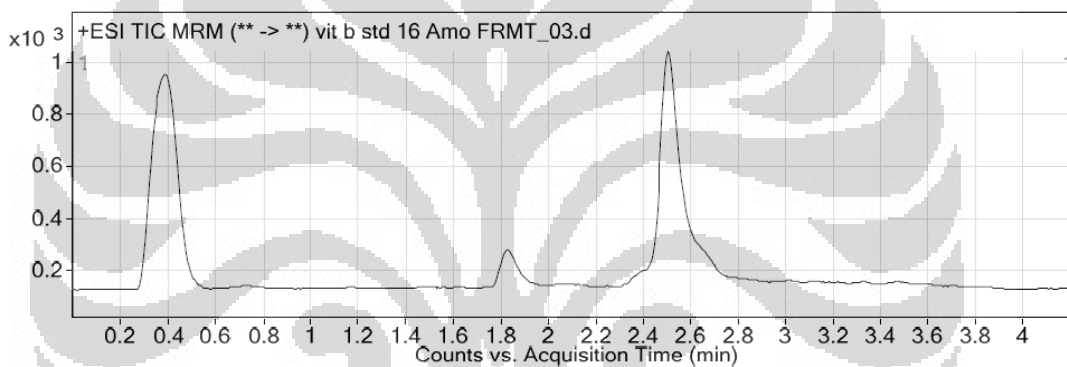
Gambar 4.38 : Kromatogram standar vitamin dengan fase gerak (Air : Metanol / 70 : 30) mengandung 20 mM Ammonium Format dan 0,1 % asam format.



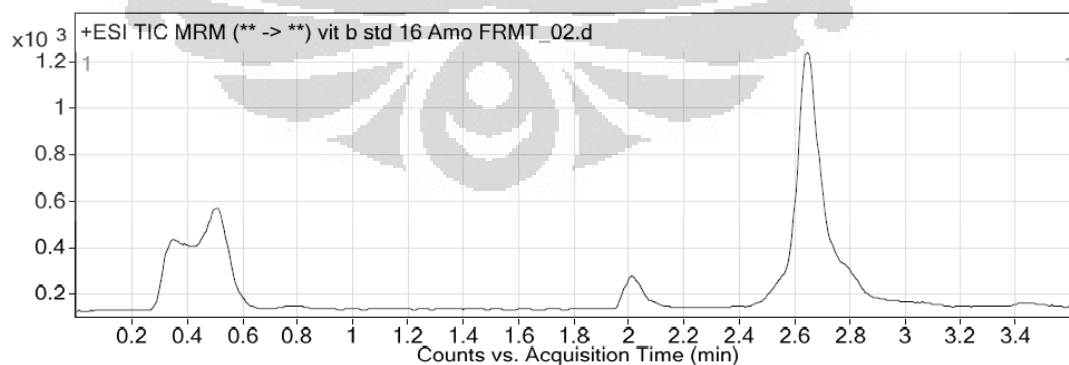
Gambar 4.39 : Kromatogram standar vitamin dengan fase gerak (Air : Metanol / 80 : 20) mengandung 20 mM Ammonium Format dan 0,1 % asam format.



Gambar 4.40 : Kromatogram standar vitamin dengan fase gerak (Air : Metanol / 90 : 10) mengandung 20 mM Ammonium Format dan 0,1 % asam format.



Gambar 4.41 : Kromatogram standar vitamin dengan fase gerak (Air : Metanol / 95 : 5) mengandung 20 mM Ammonium Format dan 0,1 % asam format.



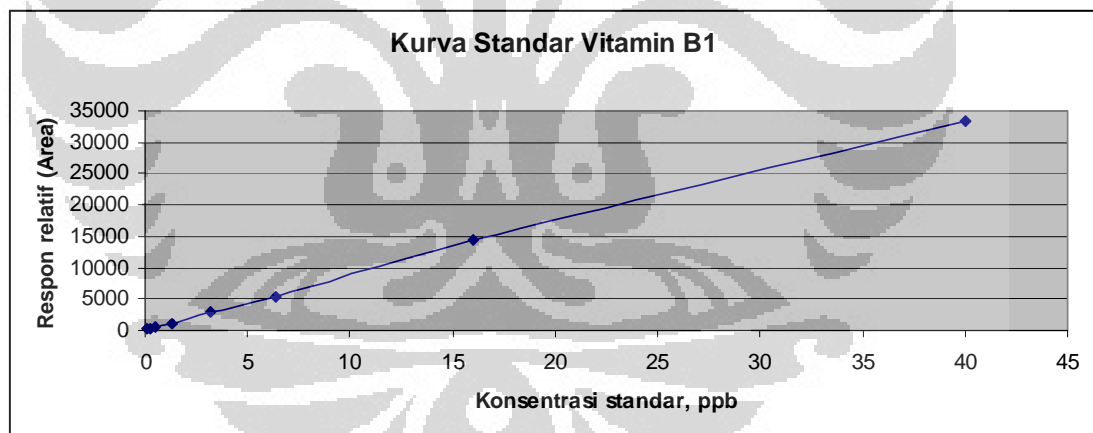
Gambar 4.42 : Kromatogram standar vitamin dengan fase gerak (Air : Metanol / 95 : 5) mengandung 20 mM Ammonium Format dan 0,1 % asam format.

Berdasarkan kromatogram diatas dapat disimpulkan bahwa kondisi pemisahan menggunakan kolom acquity HSS T3 optimal pada komposisi fase gerak 80 : 20 dengan nilai resolusi lebih besar dari 1,5 ($R > 1,5$).

Kondisi pemisahan ini digunakan untuk melakukan pengukuran standar vitamin guna pembuatan kurva kalibrasi, menghitung nilai presisi, batas deteksi, batas kuantitasi dan akurasi metoda pengukuran.

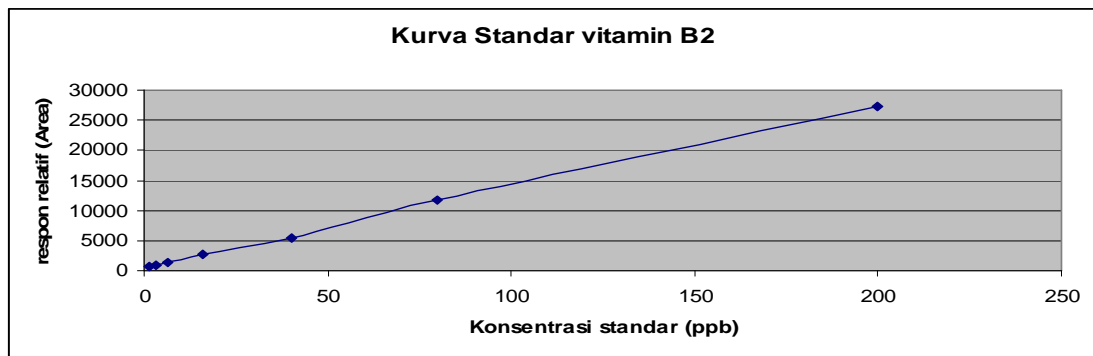
4.10.1. Penentuan Linearitas dan rentang ukur menggunakan alat agilent dan kolom waters acquity HSS T3.

Pengukuran linearitas dilakukan dengan kondisi optimasi yang sama saat menggunakan kolom agilent Zorbax SB aq dengan deret standar antara 0 sampai 200 ppb. Nilai respon relatif (area) standar yang diperoleh dibuatkan kurva standar dan dihitung koefisien korelasi, persamaan garis masing-masing vitamin sebagaimana terdapat dalam Gambar 4.43 – 4.45 berikut :



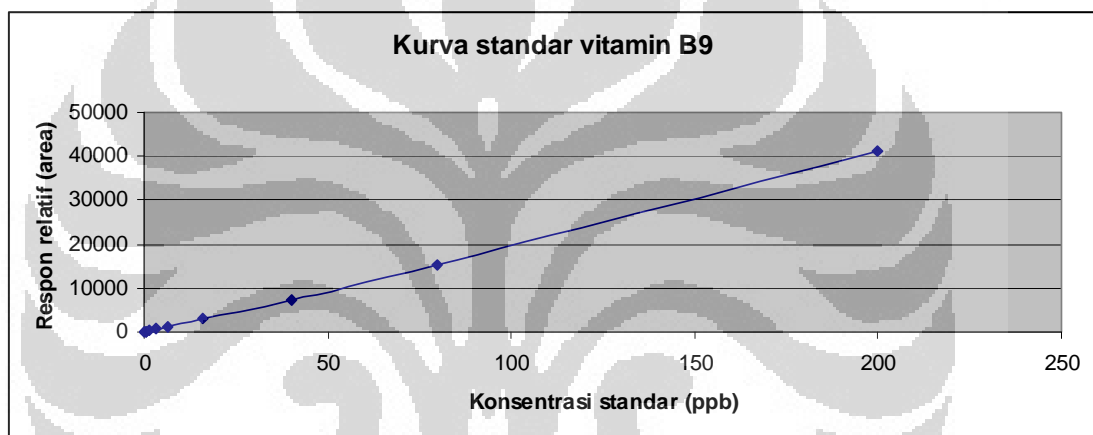
Persamaan garis : $y = 887,648 X - 17,0859$, $R = 0,999282$, $R^2 = 0,998565$

Gambar 4.43. Kurva standar vitamin B₁, persamaan garis dan koefisien korelasi menggunakan kolom waters acquity HSS T3



Persamaan garis : $y = 134,8 X + 469$, $R = 0,999694$, $R^2 = 0,999387$

Gambar 4.44. Kurva standar vitamin B₂, persamaan garis dan koefisien korelasi menggunakan kolom waters acquity HSS T3



Persamaan garis : $y = 205,4 X - 225$, $R = 0,999399$, $R^2 = 0,998798$

Gambar 4.45. Kurva standar vitamin B₉, persamaan garis dan koefisien korelasi menggunakan kolom waters acquity HSS T3

Berdasarkan perhitungan koefisien korelasi dapat disimpulkan bahwa nilai koefisien korelasi yang diperoleh memenuhi persyaratan koefisien korelasi minimal 0,995. (AOAC). Data kurva standar yang diperoleh digunakan untuk menghitung rentang ukur dari masing-masing vitamin dan diperoleh hasil sebagaimana terdapat dalam Tabel 4.9 berikut ;

Tabel 4.9 : Rentang ukur masing-masing vitamin menggunakan kolom waters acquity HSS T3.

Vitamin	Rentang Ukur
Vitamin B ₁	0,1 – 16 ppb
Vitamin B ₂	1,28 – 200 ppb
Vitamin B ₉	0,1 – 200 ppb

4.10.2. Penentuan Limit deteksi menggunakan alat agilent dan kolom waters acquity HSS T3.

Penentuan limit deteksi dilakukan dengan memperhatikan respon terkecil yang masih dapat dibedakan dengan noise dan menggunakan perhitungan melalui kurva standar. Berdasarkan data kurva standar pada butir 4.10.1 diperoleh nilai limit deteksi sebagaimana terdapat dalam tabel 4.10 berikut :

Tabel 4.10 : Nilai LOD dan LOQ masing-masing vitamin menggunakan kolom waters acquity HSS T3.

Vitamin	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Vitamin B ₁	0,0031	0,010
Vitamin B ₂	0,0046	0,015
Vitamin B ₉	0,0070	0,023

4.10.3. Penentuan Ketepatan (Akurasi) menggunakan alat agilent dan kolom waters acquity HSS T3

Penentuan Akurasi dilakukan dengan menggunakan kondisi fase gerak yang diperoleh pada butir 4.10.1 dan dihitung berdasarkan kurva kalibrasi pada butir 4.10.3. Penentuan akurasi dilakukan dengan penambahan standar (spiked) sampel yang sudah dianalisa kandungan vitamin sebelumnya. Perhitungan persen recovery dilakukan menggunakan rumus Jumlah analit yg ditemukan dibagi jumlah analit yang ditambahkan dikali 100 %.

Hasil pengukuran sampel dan nilai recovery yang diperoleh untuk masing-masing vitamin sebagaimana terdapat dalam tabel 4.11 berikut.

Tabel 4.11 : Nilai Reovery masing-masing vitamin menggunakan kolom waters acquity HSS T3.

Vitamin	Nilai yg ditemukan (ppm) (A)	Nilai Sampel (ppm) (B)	Nilai Spiked Sampel (ppm) (A-B)	Nilai yg ditambahkan (C)	% Rekovery
Vitamin B ₁	6,321	4,502	1,819	2,0012	90,89
Vitamin B ₂	4,144	2,226	1,570	2,0100	78,11
Vitamin B ₉	4,049	1,478	2,570	4,0015	64,01

Berdasarkan data diatas dapat dinyatakan bahwa nilai persen rekovery yang diperoleh sudah cukup baik dan memenuhi persyaratan rekovery yang ditetapkan AOAC sebesar 80 – 110 % untuk vitamin B₁ dan B₂, namun untuk vitamin B₉ belum memenuhi persyaratan.

BAB. 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan.

Berdasarkan data hasil percobaan dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

- a. LC-MS/MS menggunakan tehnik ionisasi *elektrospray* (ESI) dan detektor tandem spektrometri massa dapat digunakan dengan baik untuk identifikasi dan karakterisasi vitamin B₁, B₂, B₉ secara simultan.
- b. Identitas dan karakter vitamin B₁, B₂, B₉ yang diperoleh dari analisa menggunakan alat LC-MS/MS adalah puncak-puncak spesifik ion prekursor dan ion produk pada m/z 265 → 121 untuk vitamin B₁, m/z 377,1 → 243 untuk vitamin B₂ dan m/z 441,9 → 295,2 untuk vitamin B₉.
- c. Analisa Vitamin B₁, B₂, B₉ secara simultan dapat dilakukan dengan baik menggunakan dua jenis set LC-MS/-MS yang digunakan, yakni:
 - i. LC-MS/MS agilent 6430 Triple Quadrupole Mass spectrometer(QQQ) dengan kolom Zorbax RRHT SB-aq 3,0 mm x 100 mm 1,8 µm, elusi gradient dengan fase gerak air dan metanol mengandung 20 mM amonium format dan 0,1 % asam asetat, kecepatan alir 5 µl/menit.
 - ii. LC-MS/MS agilent 6430 Triple Quadrupole Mass spectrometer(QQQ) dengan kolom waters Aquity UPLC HSS T3 1,8 µm, 2,1 mm x 30 mm, elusi gradient dengan fase gerak campuran pelarut air yang mengandung 20 mM amonium format dan 0,1 % asam asetat, kecepatan alir 5 µl/menit.

- d. Kinerja metoda uji yang diperoleh menggunakan alat agilent dengan 2 jenis kolom sebagai berikut :

No	Parameter	Kolom Zorbax RRHT SB-aq			Kolom waters Aquity UPLC HSS T3		
		Vitamin B ₁	Vitamin B ₂	Vitamin B ₉	Vitamin B ₁	Vitamin B ₂	Vitamin B ₉
01	Linearity, r ²	0,99999	0,99977	0,99988	0,99856	0,9999387	0,99879
02	Rentang Ukur (ppb)	6,905 – 446,47	1,243 – 452,029	0,5494 – 429,24	0,1 - 16	1,28 - 200	0,1 - 200
03	LOD (ppm)	0,0004	0,0005	0,0035	0,0031	0,0046	0,0070
04	LOQ (ppm)	0,00133	0,0023	0,011	0,010	0,015	0,023
05	% Rekoverly	-	-	-	90,89	78,11	64,01

5.2. Saran

Untuk meningkatkan derajat kepercayaan penelitian ini maka perlu diadakan uji collaborative antar laboratorium dan melakukan penelitian lanjutan untuk mencari kondisi optimal ekstraksi secara simultan vitamin B₁, B₂, B₉ serta penetapan kinerja metoda lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- AGAL, (2009), *Proficiency Testing*, AQA 09-21 Folic Acid in Flour.
- Andarwulan,N & Koswara,S (1992), *Kimia Vitamin*, Bogor, CV.Rajawali.
- Aptindo, (2010), *Kronologi Penerapan SNI Tepung Terigu*.
- Agilent Application Note (2008), *Quantitative Analysis of Water Soluble B-Vitamin in Cereals using Rapid Resolution LC/MS/MS*,
<http://www.agilent.com/chem>.
- Badan Standardisasi Nasional (BSN), (2009) *Standar Nasional Indonesia 3751 2009, Tepung Terigu sebagai bahan pangan*.
- Badan Standardisasi Nasional (BSN), (2008) *Standar Nasional Indonesia ISO/IEC 17025 2008, Persyaratan Umum Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*.
- Bieman Klaus,. (1993) *Tandem Mass Spectrometry For Organic Trace Analysis, Pure & Appl, Chem.*, Vol.65. No. 5, pp. 1021-1027.
- Boen, T.R, et.all (2008) *Folic Acids and Iron Evolution in Brazilian Enriched Corn and wheat flour*. Journal of Brazilian Chem, Soc, Vol.19 No.1, pp 53 – 59.
- Eitenmiller, et.all (2008) *Vitamin Analysis For Health and Food Science*, Second Edition, CRC Press
- Engel, Rita (2009), *Dissertation and thesis from start to finish : Development of analytical Methods for Determination of water soluble Vitamin in functional food product*, Budapest, faculty of Food Science, Departemnt of Applied Chemistry, Corvinus University.
- Danzer,K. (2007). *Analytical Chemistry*. Berlin : Spinger.
- De Man, John.M, (1999). *Principle of Food Chemistry* (Ed.ke-3), New York : Spinger.
- De Hoffman, E. Charettes, Jean, Stroobant,V (1996) *Mass Spectrometry Principle & Application*, Paris : Wiley.
- De Hoffman,E & Stroobant,V (2008), *Mass Spectrometry, Principle & Application*, (Ed. Ke-3), England, Wiley.

- Gaskell, Simon, J. (1997), *Electrospray : Principle and Practice*, Journal of Mass spectrometry, Vol 32, pp 677-688,
- Glish, G.L & Vachet., R.W (2003) *The Basic of Mass Spectrometry in Twenty First Century, Review*, Volume 2, <http://www.nature.com>.
- Griffith, J,W, et.all (2001),. *Elektrospray and tandem Mass spectrometry in Biochemistry*, Journal of Biochemistry, 305, pp. 545 – 561.
- Harmita (2004), *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan cara perhitungannya*, Majalah Ilmu Farmasi, Vol.I, No.3, pp. 117 – 135.
- Harvey, David (2000), *Modern Analytical Chemistry* (International Edition), Singapore : McGraw-Hill.
- Huber, Ludwig, (2007), *Validation and Qualification in Analytical laboratories*, (Ed.ke-2), New York, Informa Health care.
- Lehninger, L.Alber. (1982). *Dasar-dasar Biokimia* (Maggy Thena Widjaja, penerjemah), Jakarta, Erlangga.
- Martin, Julio, et.all (2008), *Validated Methods to Quantify Folic Acid in Wheat Flour Sample using Liquid Chromatography-Tandem MS*, Journal Of Brazilian, Chem, Soc, Vol.19, No.5 pp. 971 -977.
- Mezwa, M, et.all (2006), *Application of UPLC-Tandem Mass spectrometry to the analysis of priority pesticide in ground water*, Journal of Chromatography.
- Miller, J.C. Miller, J.N (1984), *Statistic for Analytical Chemistry*, England, Wiley.
- Miller, J.N & Miller, J.C (2000) *Statistic and Chemometric for Analytical Chemistry* (Ed.ke-4), England : Prentice Hall.
- Nollet, Leo M.L (Ed). (2004). *Handbook of Food Analysis* (Ed.ke-2). New York : Marcell Dekker.
- Patch,,K.N, et.all (2010) *UPLC : AnIntroduction and It's Application*, Pharm Expt Review, Vol 01, Issue 01
- Patil, V.P, et.all (2011) *UPLC : A Review, International Research*, Journal of Pharmacy (IRJP), volume 2, (6) pp. 39 – 44.
- Rylich, Michael (2011) *Fortified food with vitamin, Analytical Concept to Assure Beter*, German, wiley.

Robart, K. Haddad, P. R. Jackson, P. E. (2001). *Principle and Practice of Modern Chromatography Methods*, London, Academic Press.

Robinson, James. W., Skelly, F. E. & Frame LL, G. M. (2005) *Undergraduate Instrumental Analysis* (Ed. ke-6), New York, Macell Dekker.

Roge, A. B., et. al (2011), *Novel Achievement of HPLC : UPLC International Journal of Pharm Tech Research*, Vol.3, no.3 pp.1423 – 1429.

Rohman, Abdul, (Sept 2011), *Analisis Bahan Pangan*, Yogyakarta, Pustaka Pelajar

Sadek, P (2002), *The HPLC Solvent Guide*. (Ed. ke-2) New York : Wiley

Supratman, U. (2010) *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*, Bandung, Widya Pajajaran.

Shimadzu Application news (2000), *Evaluation of uncertainty in High Performance Liquid Chromatography*.

Shukla, Andi K, & Futrell Jean, H, (2000) *Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation*, Journal of Mass Spectrometry, 35, pp 1069 – 1090..

Snyder, R, LLOYD. et. al (1997) *Practical HPLC methods development* (Ed. ke-2), New York. Wiley.

Simpson, Nigel, J. K (Ed). (2000), *Solid Phase Extraction, Principle Technique and Application*, New York : Marcell Dekker.

Srivastava, B., et. al (2010) *UPLC : A, chromatography Technique International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance* 2 (1) ; pp. 19 – 25,
<http://www.upqa.com>.

Swartz, Michael E & Murphy, Brian J, (2004), *Ultra Performance Liquid Chromatography : tomorrow's HPLC Technology today*, LPI.

Swartz, Michael, E (2005), *UPLC : an Introduction, waters*,
<http://www.chromatographyonline.com>.

Thompson, Michael, Ellison .et. al (2000), *Harmonized Guidelines For Single-Laboratory Validation Of Methods Of Analysis*. pp.835-855, 2002 IUPAC.

USAID, (2010), *Manual of Methods For Determining Micronutrient in Fortified Foods*.

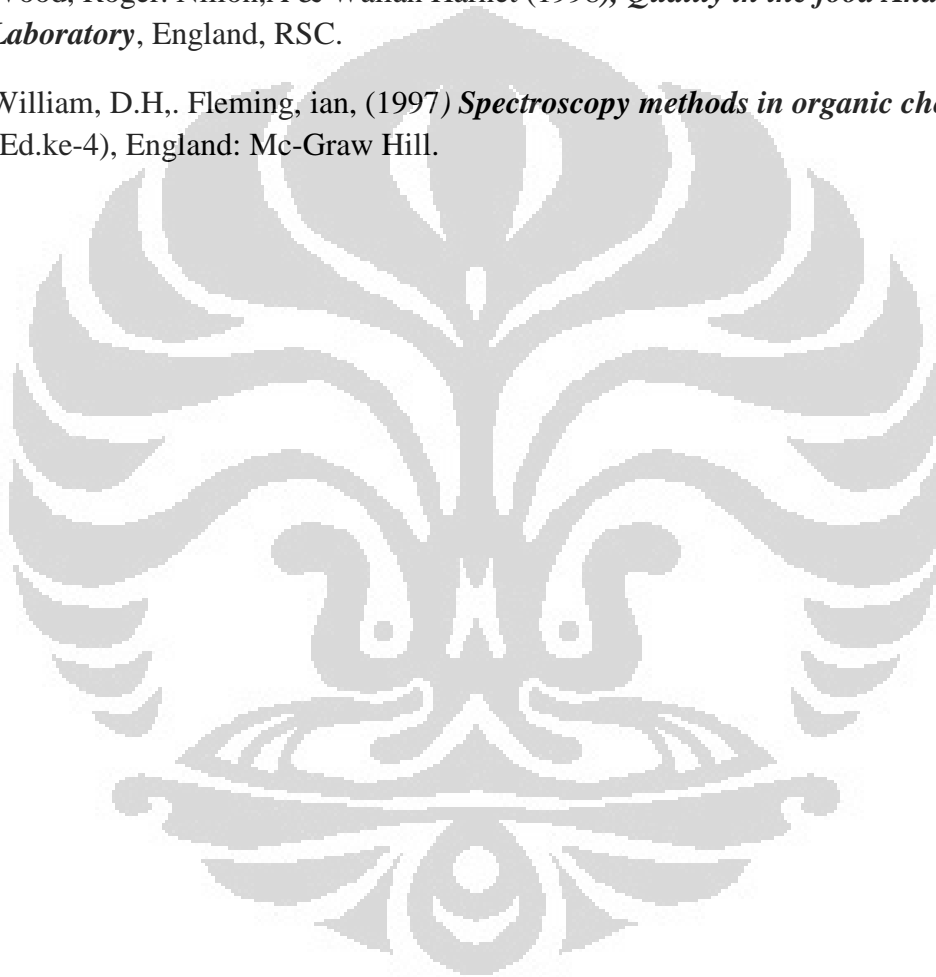
Vanata, L.E & Coleman, D.E (2007) *Calibration, Uncertainty and Recovery in the chromatography science*, Journal of chromatography A, 1158 (2007) 47 – 60, <http://www.sciencedirect.com>.

Watson, J.Throck. Sparkman, O.David (2007). *Mass Spectrometry* (Ed.ke-4), England, Wiley.

Whittaker, PhD, et.all (2001) *Iron and Folat in Fortified Cereals*, *Journal of The American College of Nutrition*, Vol.20, No.3, 247 – 254.

Wood, Roger. Nillon,A & Wallan Harnet (1998), *Quality in the food Analysis Laboratory*, England, RSC.

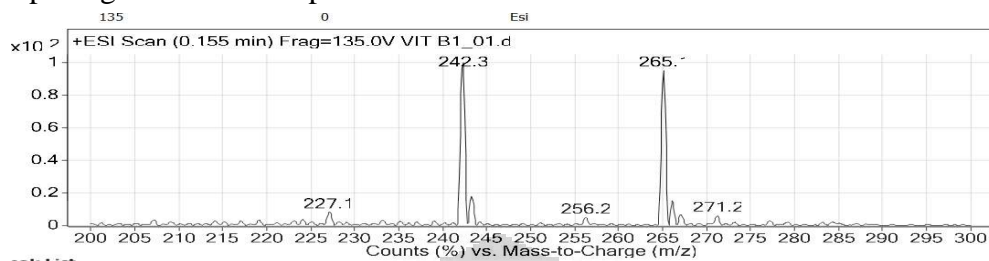
William, D.H., Fleming, ian, (1997) *Spectroscopy methods in organic chemistry* (Ed.ke-4), England: Mc-Graw Hill.



LAMPIRAN

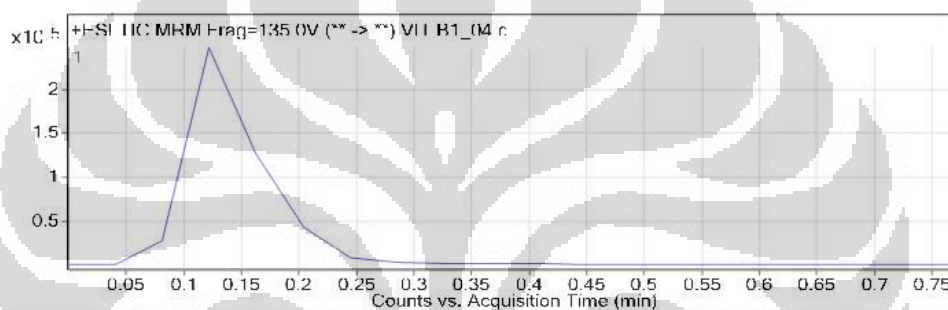
Lampiran 1. Spektrogram massa optimasi ion prekursor vitamin B₁

Spektrogram massa ion prekursor

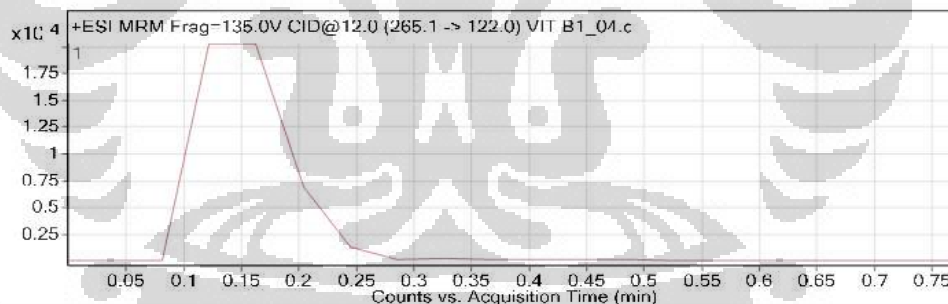


Peak List

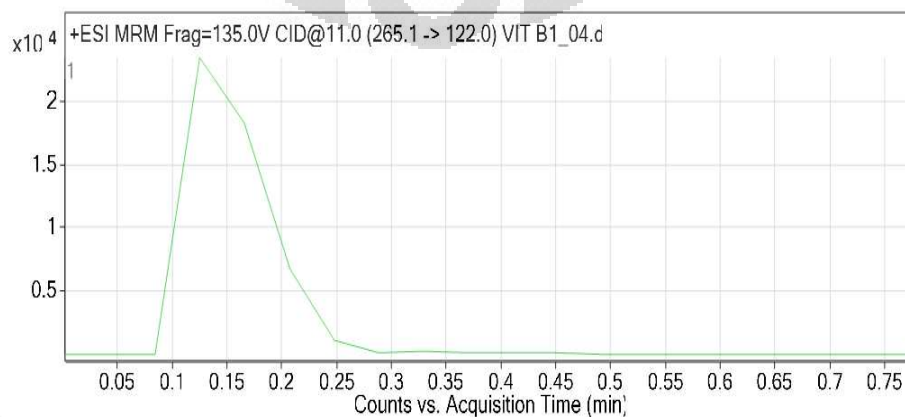
Energi collision 10, 11 dan 12



Fragmentor Voltage	135	Collision Energy	12	Ionization Mode	ESI
--------------------	-----	------------------	----	-----------------	-----



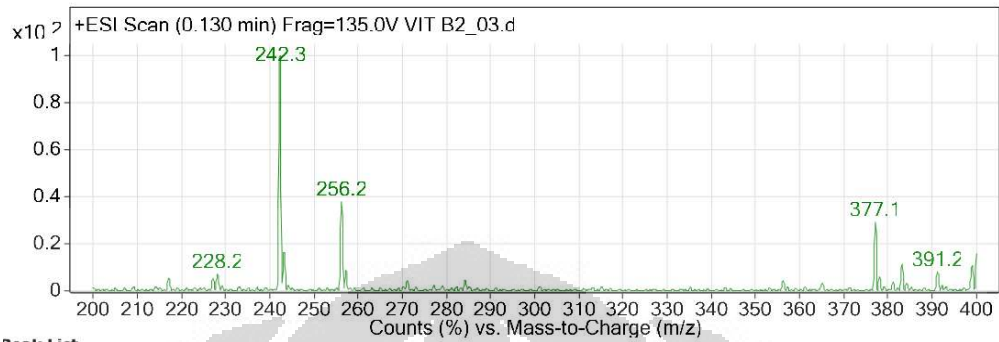
Fragmentor Voltage	135	Collision Energy	11	Ionization Mode	ESI
--------------------	-----	------------------	----	-----------------	-----



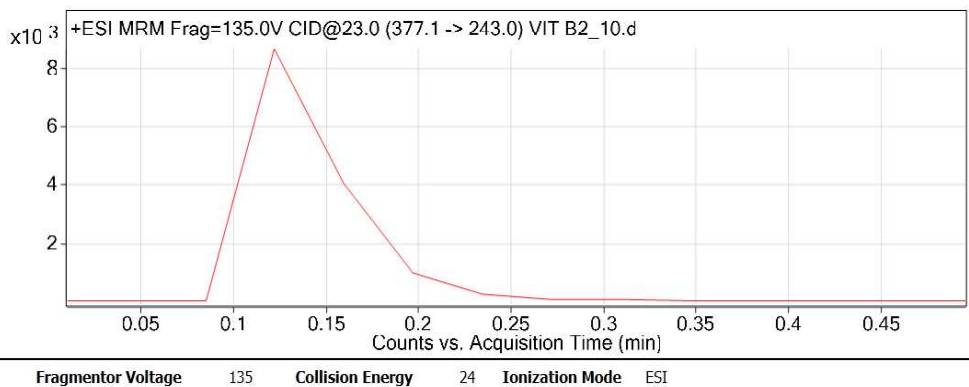
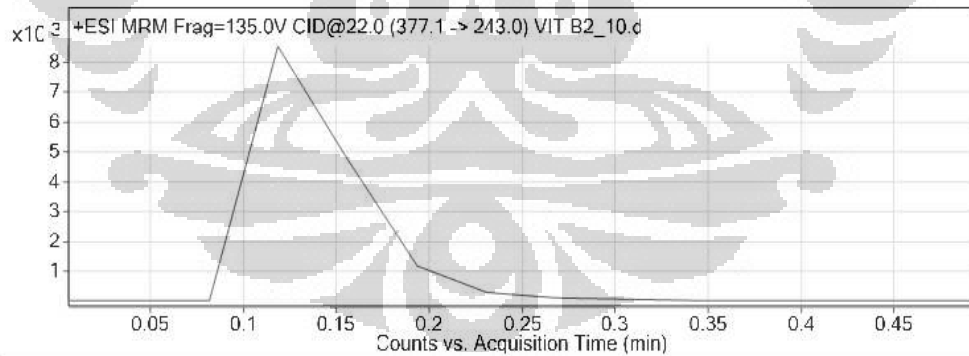
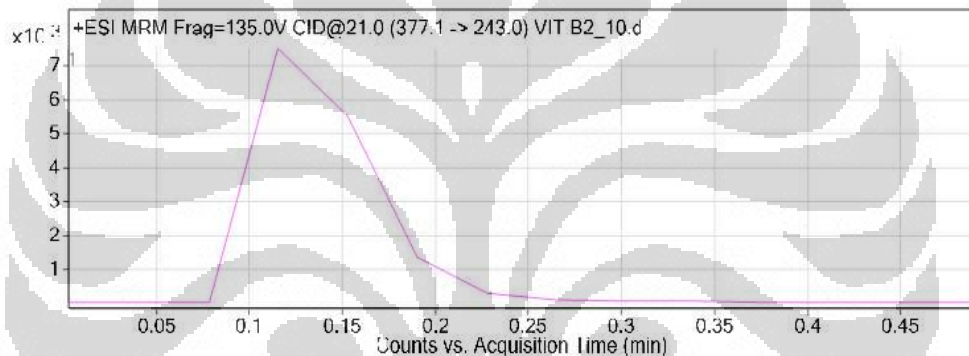
Fragmentor Voltage	135	Collision Energy	10	Ionization Mode	ESI
--------------------	-----	------------------	----	-----------------	-----

Lampiran 2. Spektogram massa optimasi ion prekursor vitamin B₂

Spektogram mass ion prekursor

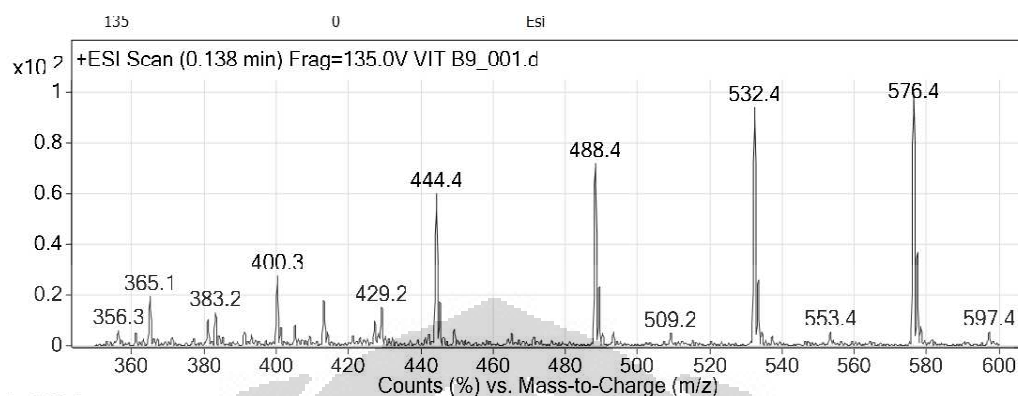


Energi Collision 22, 23 dan 24

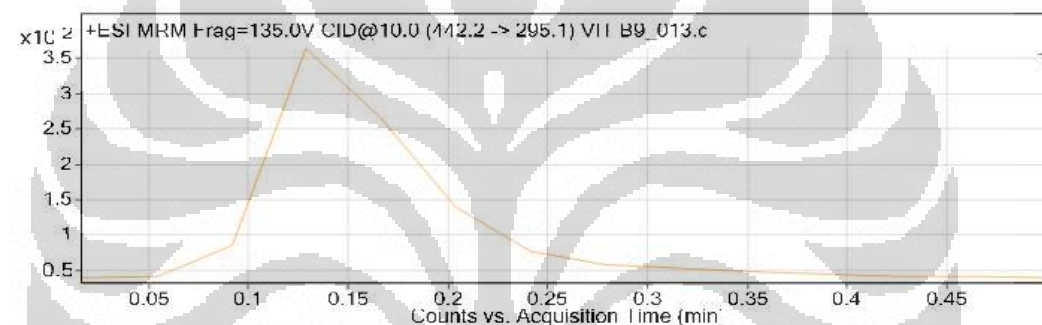


Lampiran 3. Spektogram massa optimasi ion prekursor vitamin B₉

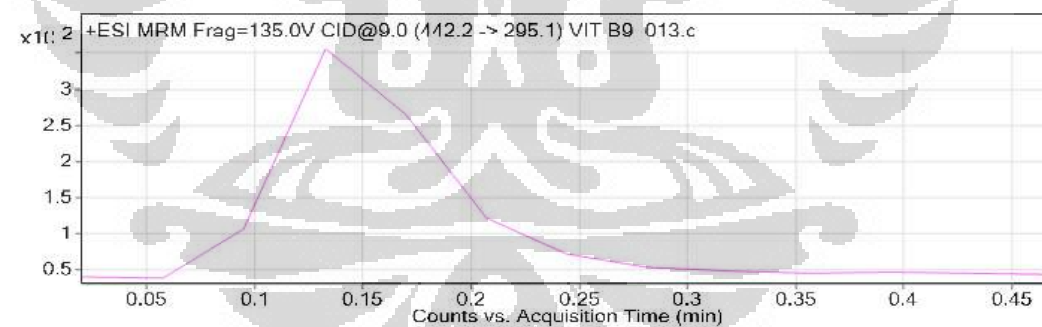
Spektogram massa ion prekursor



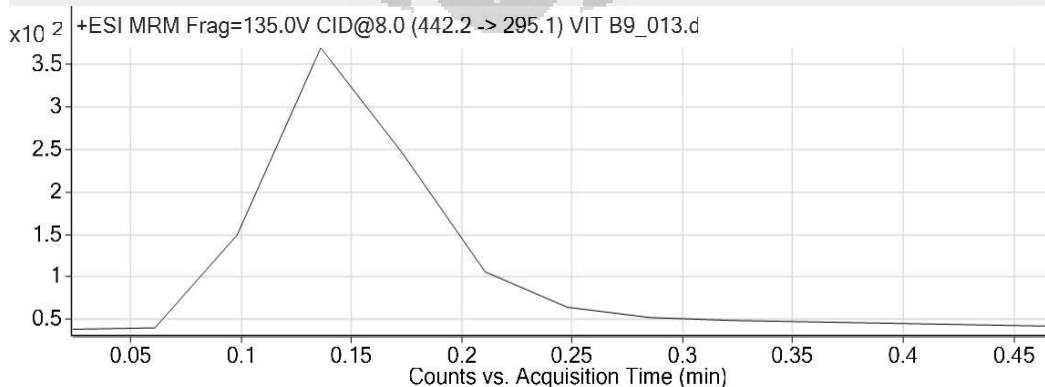
Energi collision 9,8 dan 7



Fragmentor Voltage 135 Collision Energy 9 Ionization Mode ESI



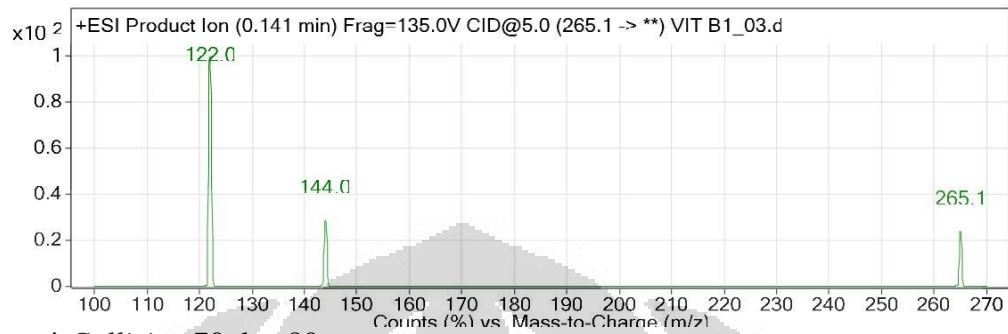
Fragmentor Voltage 135 Collision Energy 8 Ionization Mode ESI



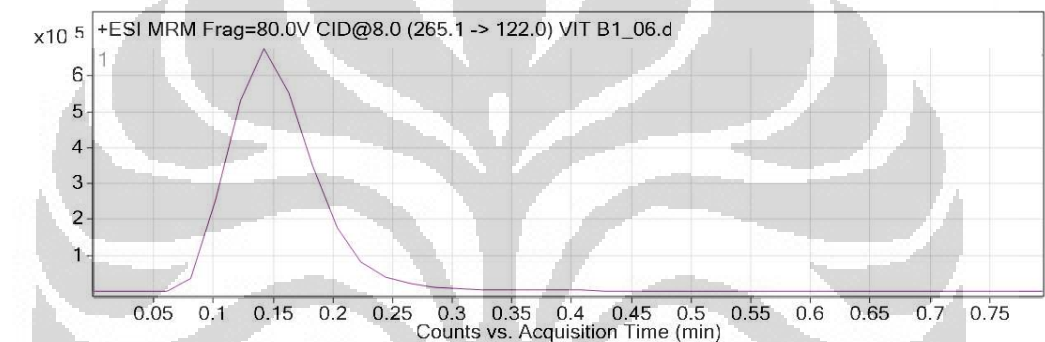
Fragmentor Voltage 135 Collision Energy 7 Ionization Mode ESI

Lampiran 4. Spektrogram massa optimasi energi pembentukan ion produk vitamin B₁

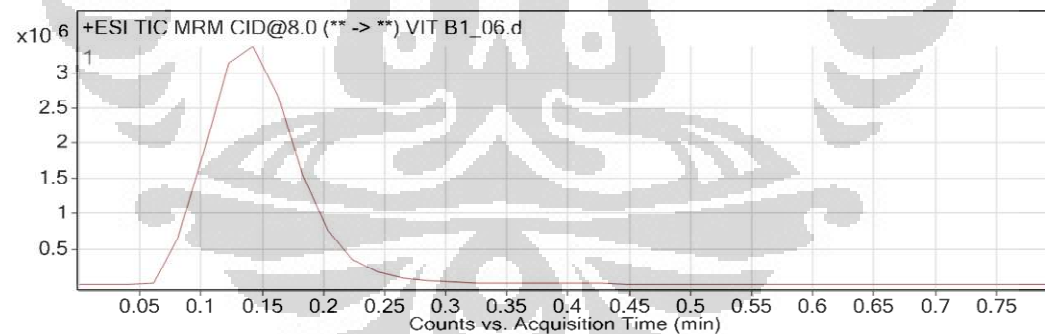
Spektrogram massa



Energi Collision 70 dan 80

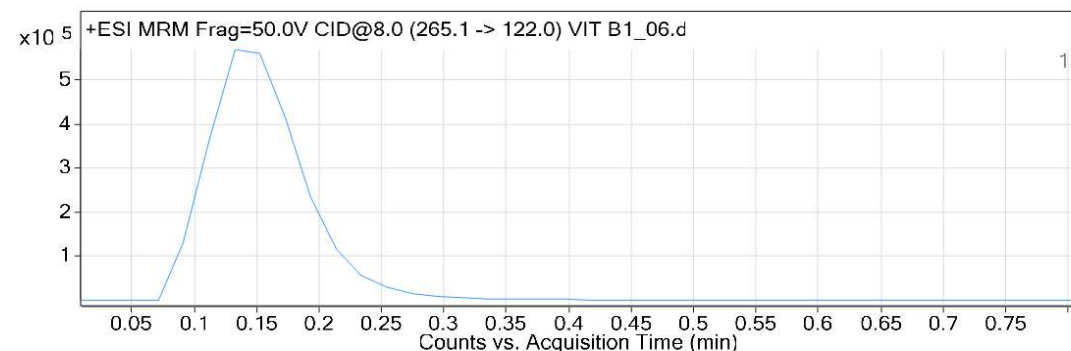


Fragmentor Voltage 70 Collision Energy 8 Ionization Mode ESI



Fragmentor Voltage 80 Collision Energy 8 Ionization Mode ESI

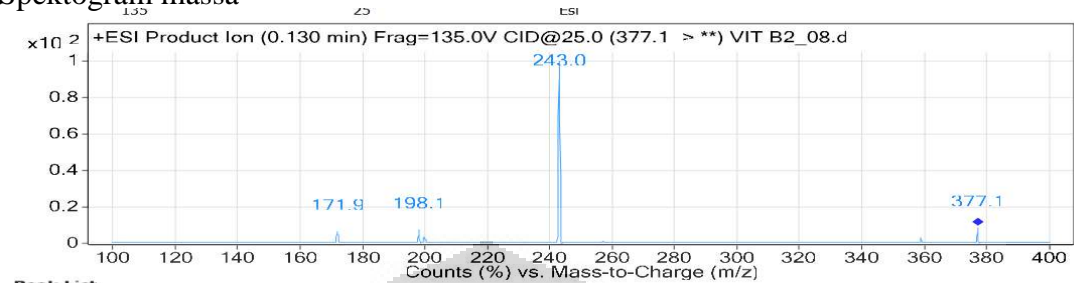
Energi Collision 90



Fragmentor Voltage 90 Collision Energy 8 Ionization Mode ESI

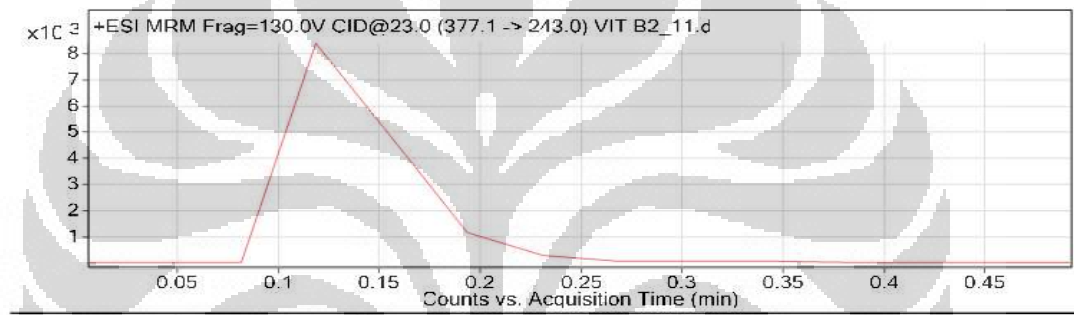
Lampiran 5. Spektrogram massa optimasi energi pembentukan ion produk vitamin B₂

Spektrogram massa

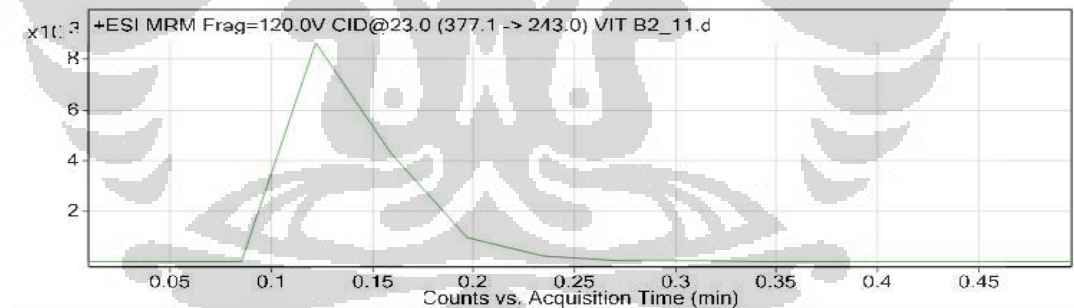


Peak List

Energi collision 120 dan 110

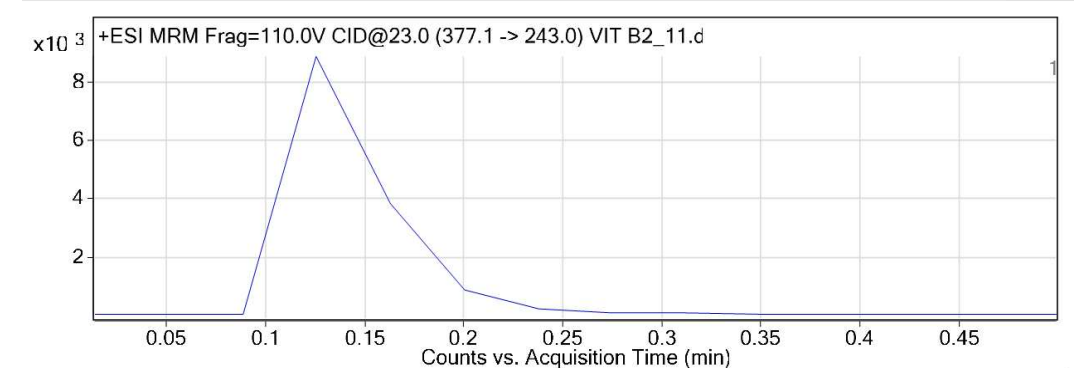


Fragmentor Voltage 120 Collision Energy 23 Ionization Mode ESI



Fragmentor Voltage 110 Collision Energy 23 Ionization Mode ESI

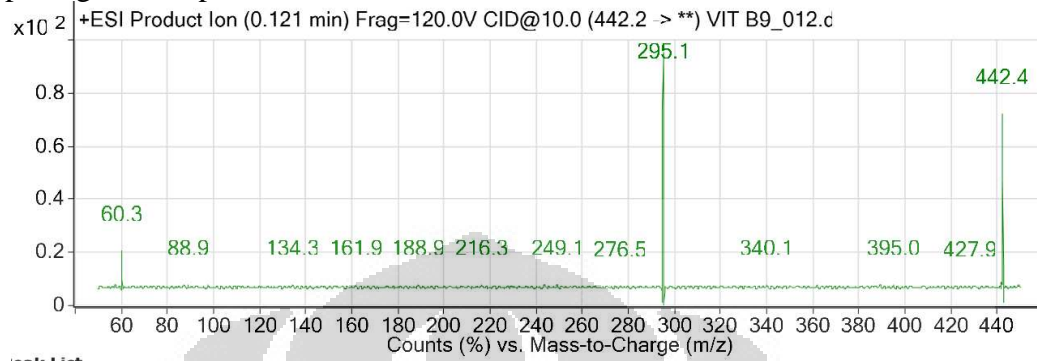
Energi Collision 100



Fragmentor Voltage 100 Collision Energy 23 Ionization Mode ESI

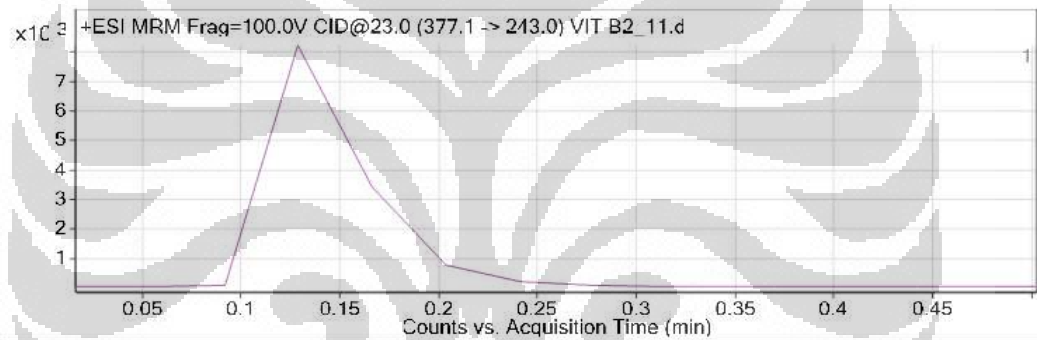
Lampiran 6. Spektrogram massa optimasi energi pembentukan ion produk vitamin B₉

Spektrogram ion produk

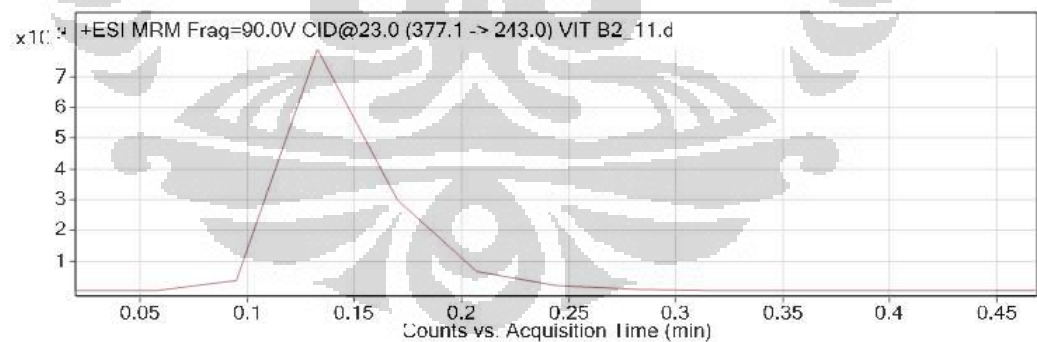


Peak List

Energi *Collision* 90 dan 80

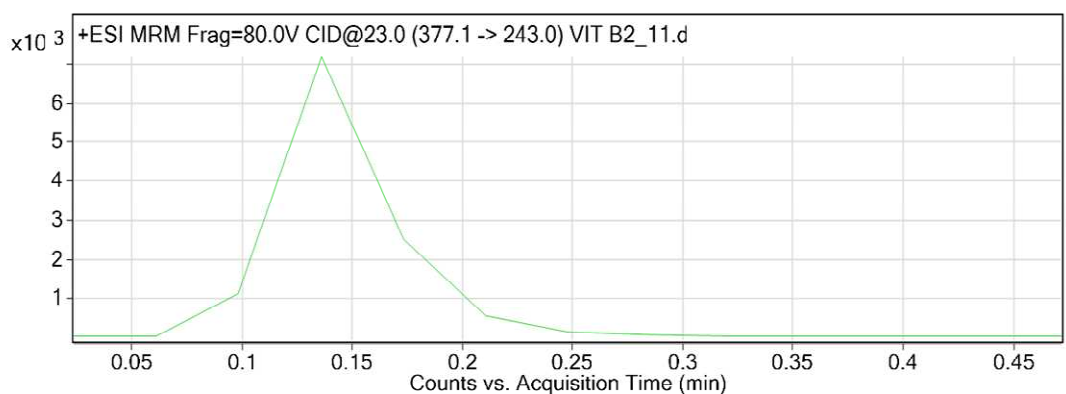


Fragmentor Voltage 90 Collision Energy 23 Ionization Mode ESI



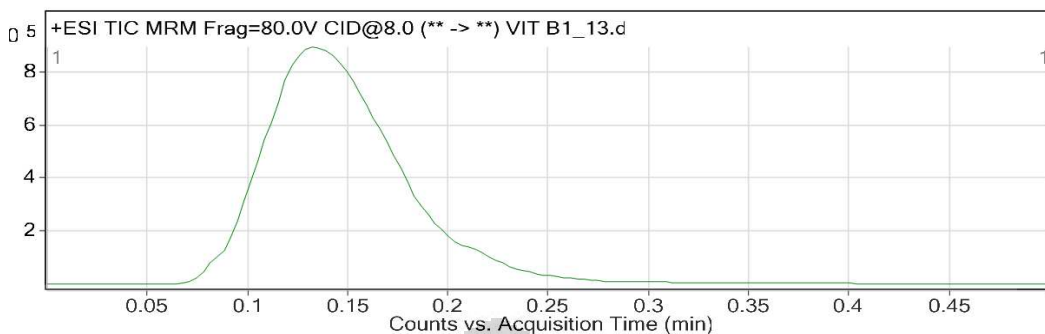
Fragmentor Voltage 80 Collision Energy 23 Ionization Mode ESI

Energi *Collision* 70

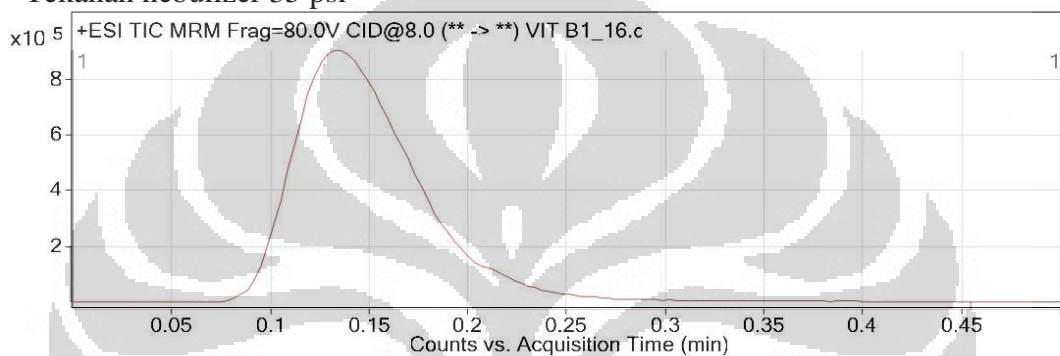


Fragmentor Voltage 70 Collision Energy 23 Ionization Mode ESI

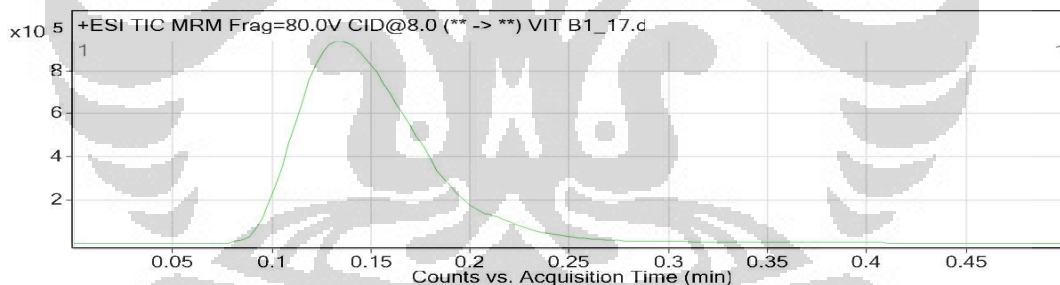
Lampiran 7. Spektrogram massa optimasi nebulizer untuk ionisasi vitamin B₁
Tekanan nebulizer 40 psi



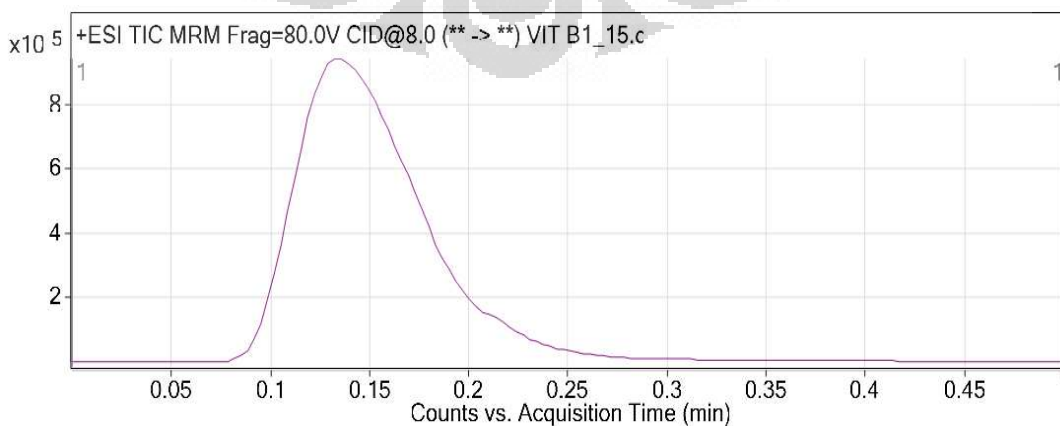
Tekanan nebulizer 35 psi



Tekanan nebulizer 30 psi

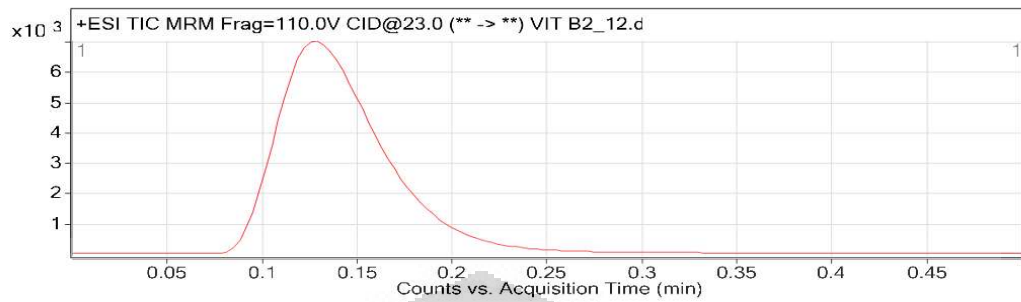


Tekanan nebulizer 25 psi

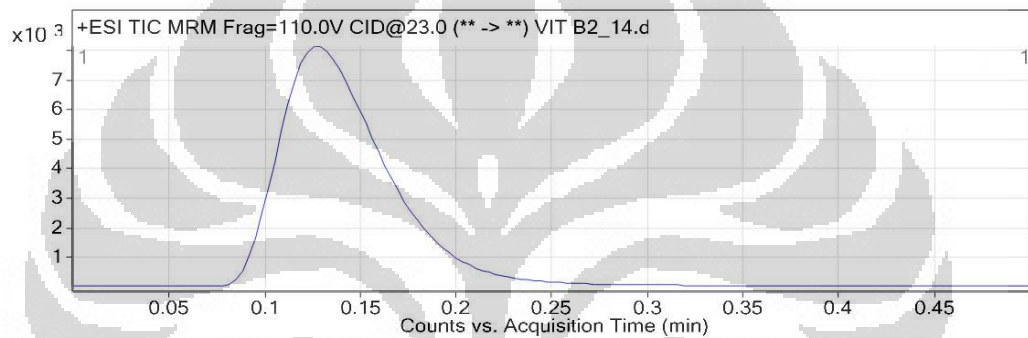


Lampiran 8. Spektogram massa optimasi nebulizer untuk ionisasi vitamin B₂

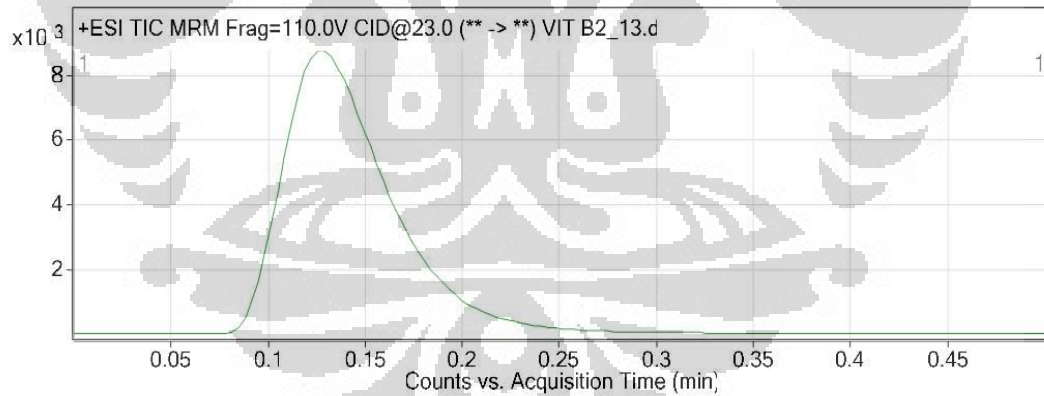
Tekanan nebulizer 40 psi



Tekanan nebulizer 30 psi

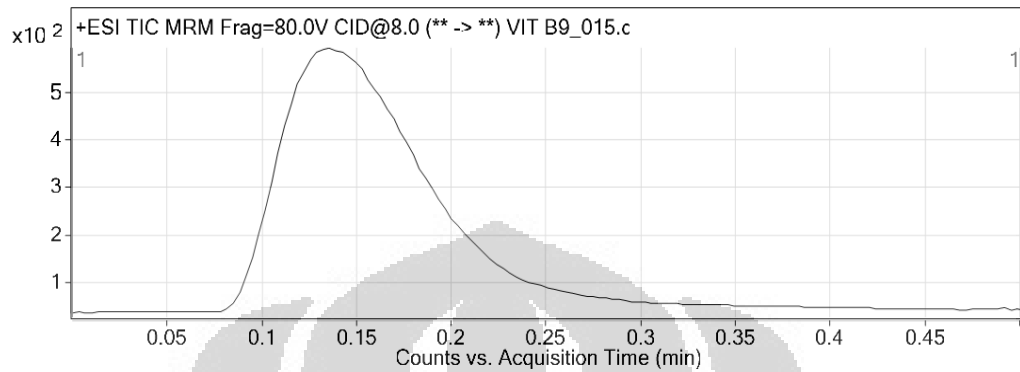


Tekanan nebulizer 20 psi

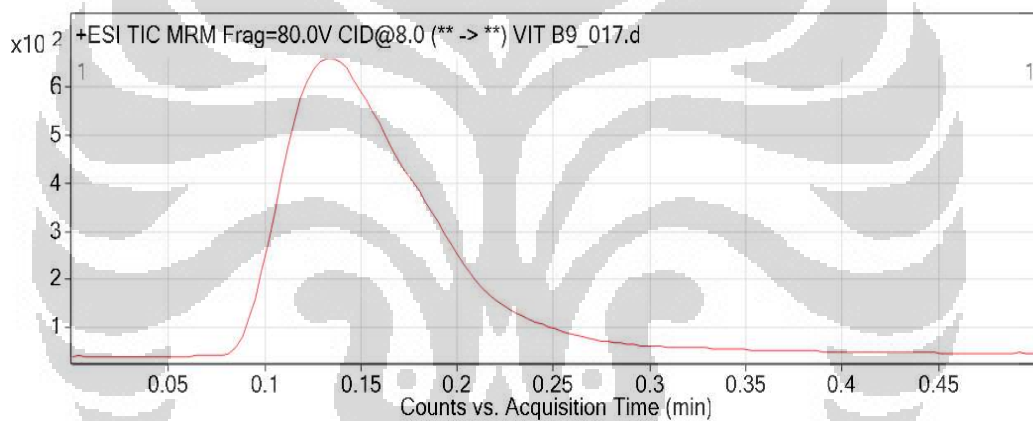


Lampiran 9. Spektogram massa optimasi nebulizer untuk ionisasi vitamin B₉

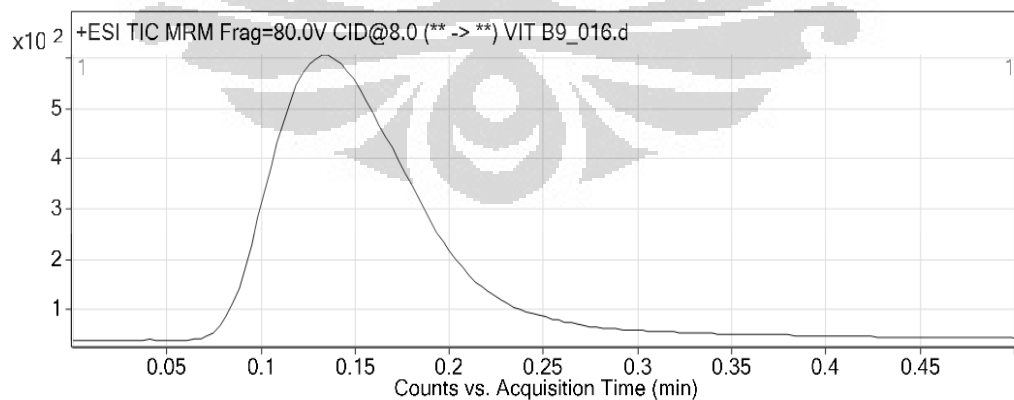
Tekanan nebulizer 40 psi



Tekanan nebulizer 30 psi

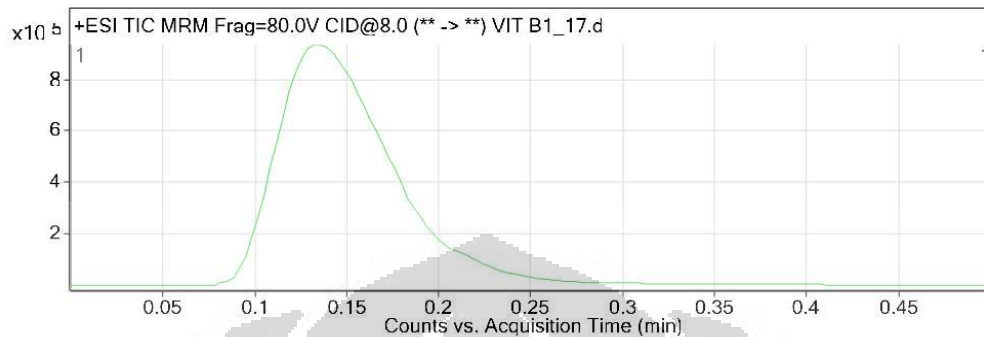


Tekanan nebulizer 20 psi

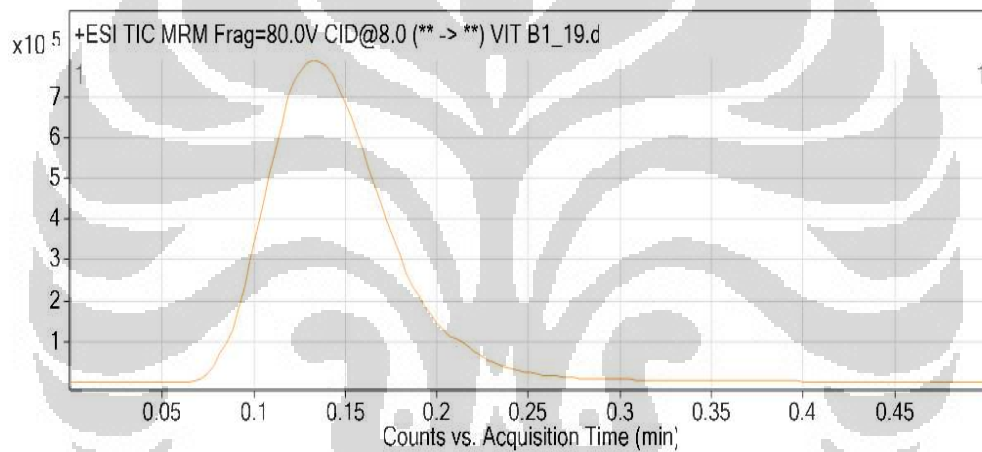


Lampiran 10. Spektogram massa optimasi laju alir gas ionisasi vitamin B₁

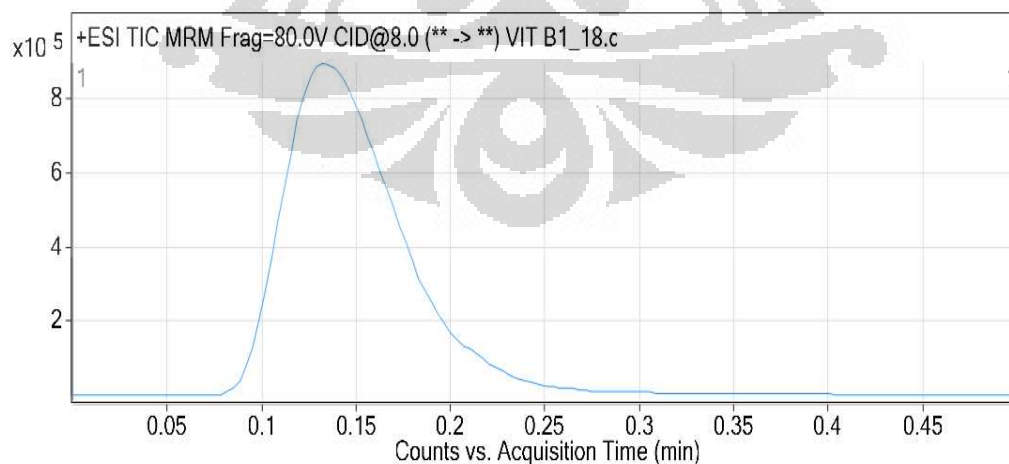
Laju alir gas 11 L/menit



laju alir gas 10 L/menit

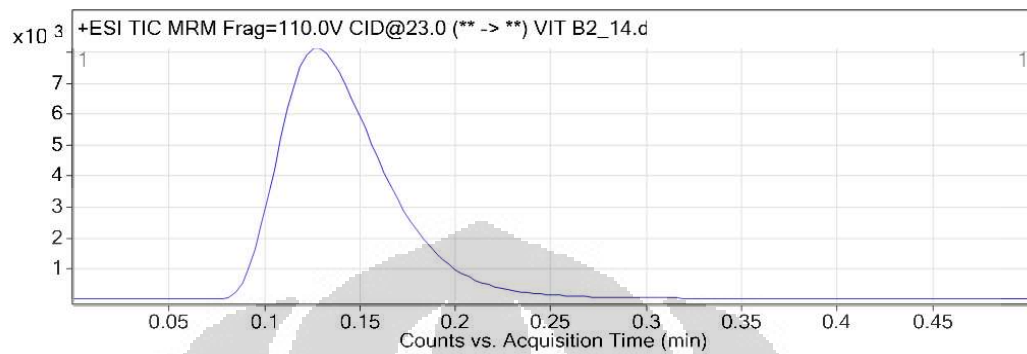


Laju alir gas 9 L/menit

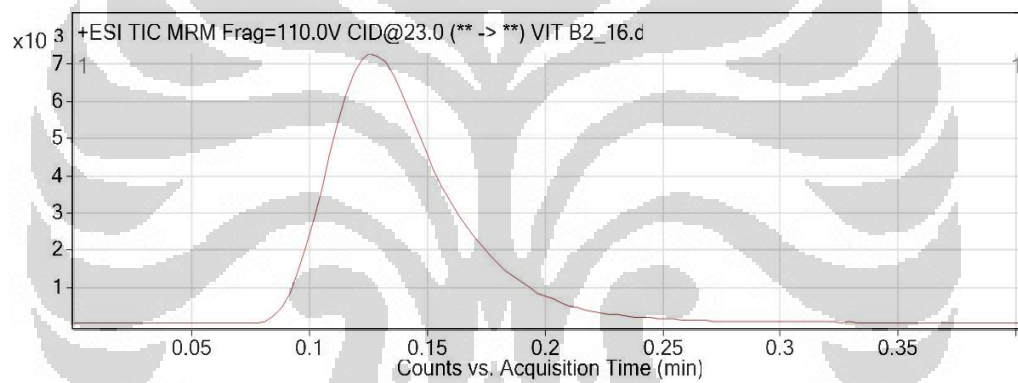


Lampiran 11. Spektogram massa optimasi laju alir gas ionisasi vitamin B₂

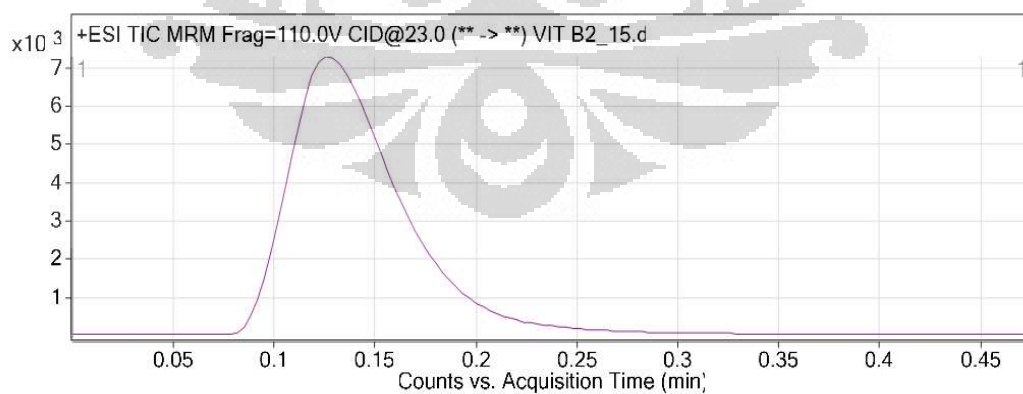
Laju alir gas 11 L/menit



Laju alir gas 10 L/menit

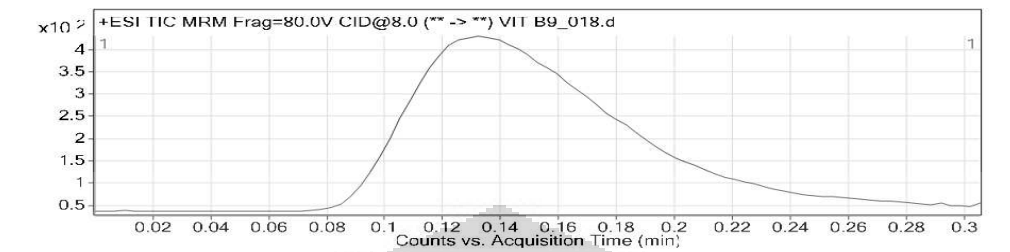


Laju alir gas 9 L/menit

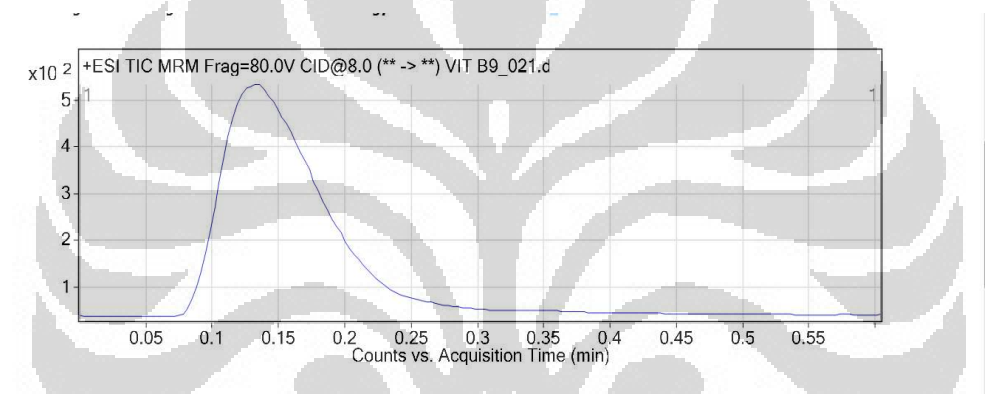


Lampiran 12. Spektogram massa optimasi laju alir gas ionisasi vitamin B₉

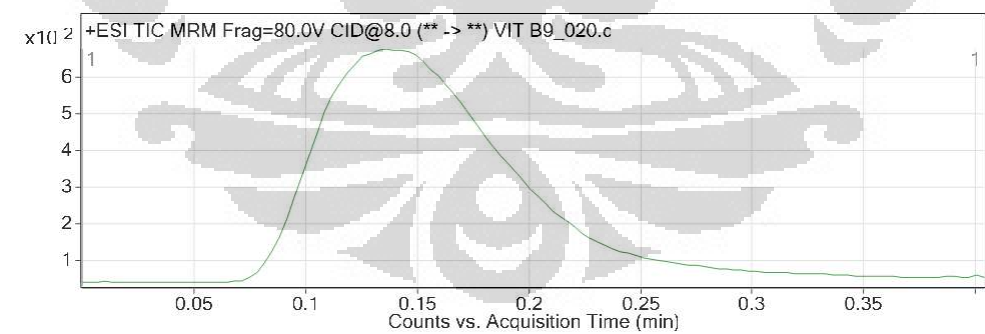
Laju alir gas 11 L/menit



Laju alir gas 10 L/menit

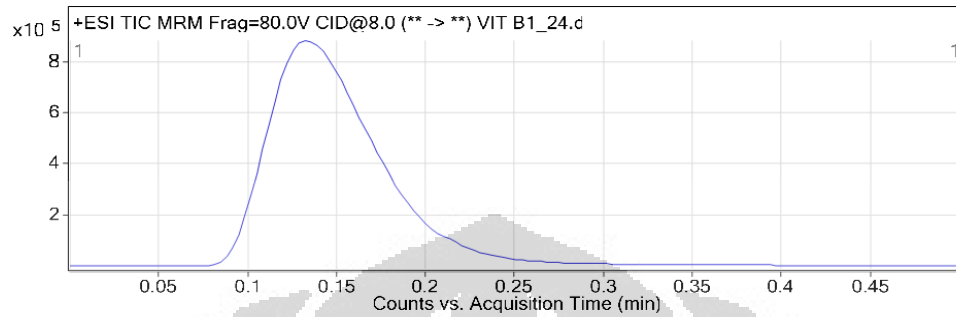


Laju alir gas 9 L/menit

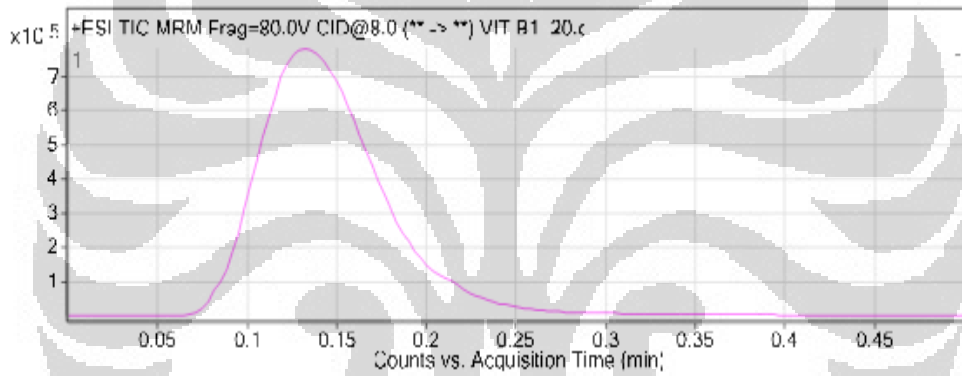


Lampiran 13. Spektogram massa optimasi temperatur gas.

Spektogram massa temperatur gas 350°C vitamin B₁



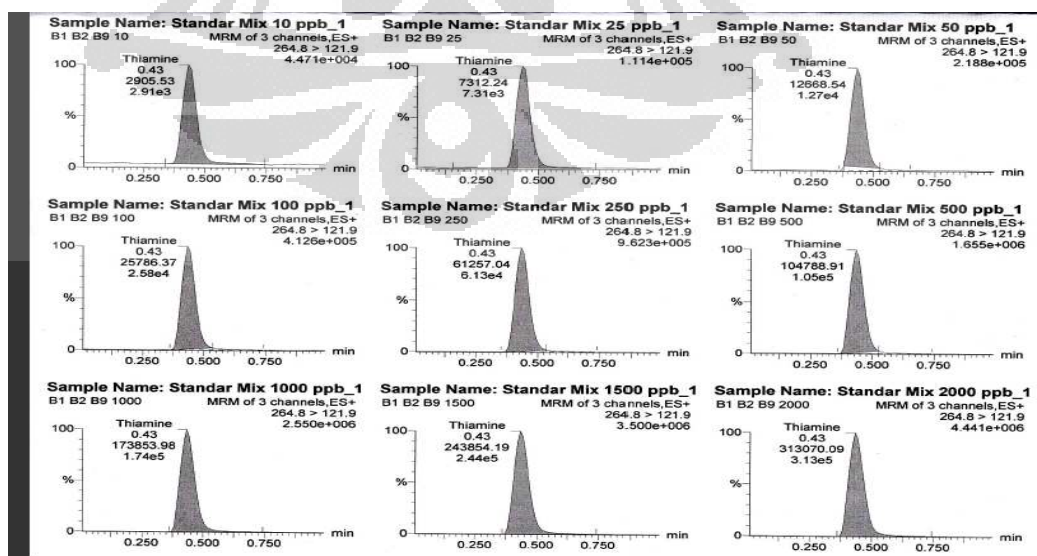
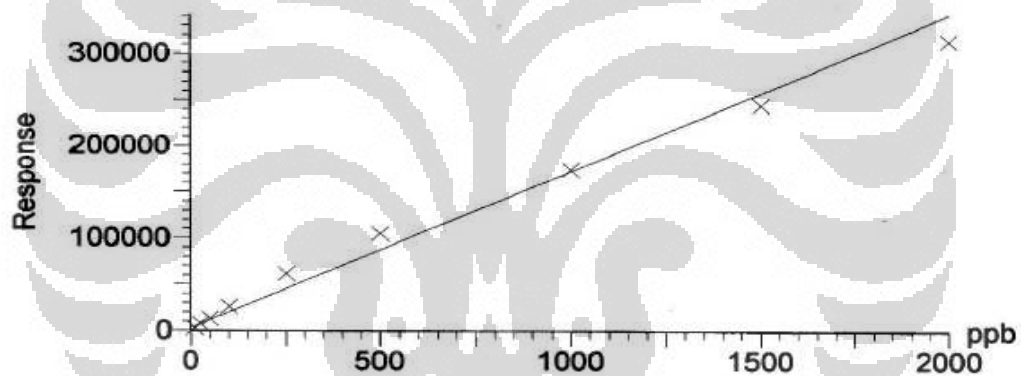
Spektogram massa temperatur gas 325°C vitamin B₁



Lampiran 14. Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B₁ serta kromatogram standar dengan alat merk water.

No	Konsentrasi Standar vitamin B ₁ (µg/L)	Respon relatif (Area)
1	10	2905,53
2	25	7312,241
3	50	12668,554
4	100	25786,371
5	250	61257,043
6	500	104788,914
7	1000	173853,984
8	1500	243854,188
9	2000	313070,094

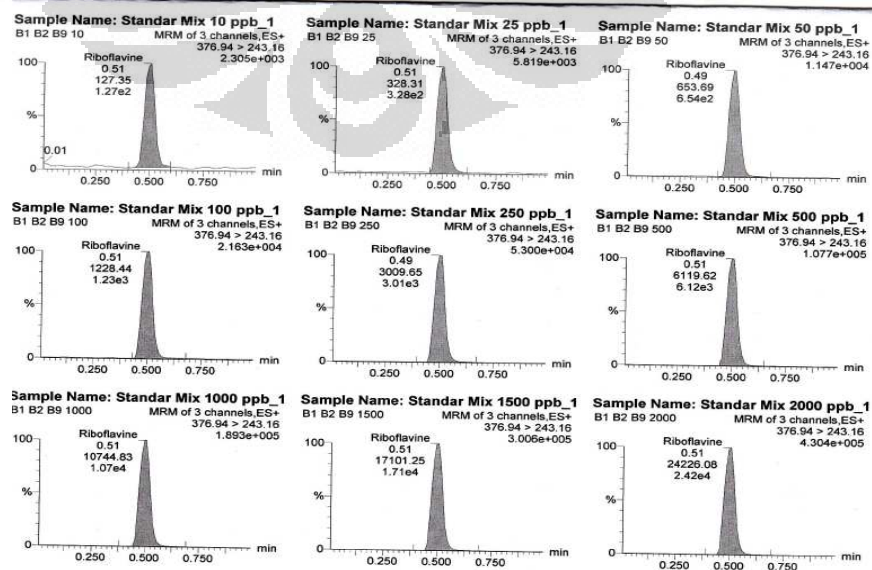
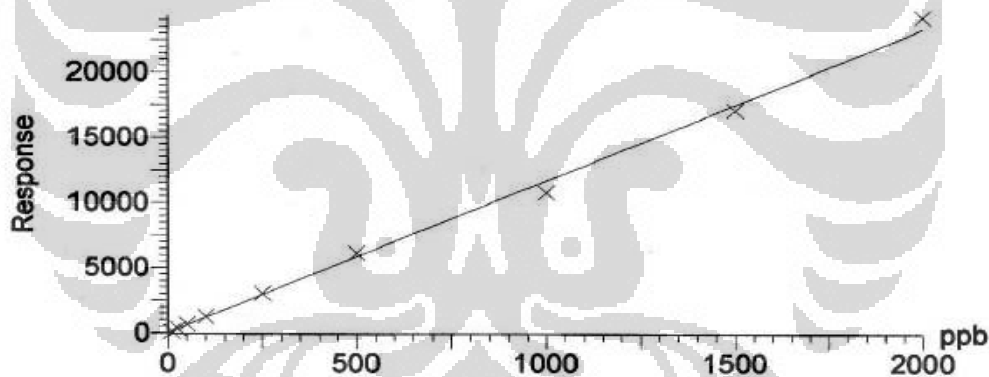
Persamaan garis : $Y = 11392,42 * X + 155,099$.



Lampiran 15. Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B₂ serta kromatogram standar dengan alat merk water.

No	Konsentrasi Standar vitamin B ₂ (µg/ml)	Respon relatif (Area)
1	10	127,35
2	25	328,31
3	50	653,69
4	100	1228,44
5	250	3009,65
6	500	6119,62
7	1000	10744,83
8	1500	17101,25
9	2000	24226,08

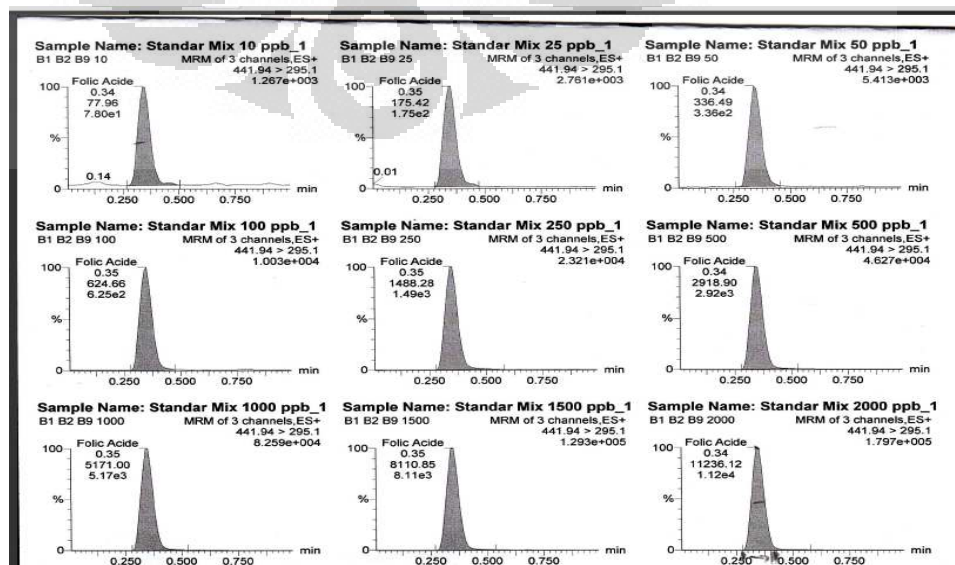
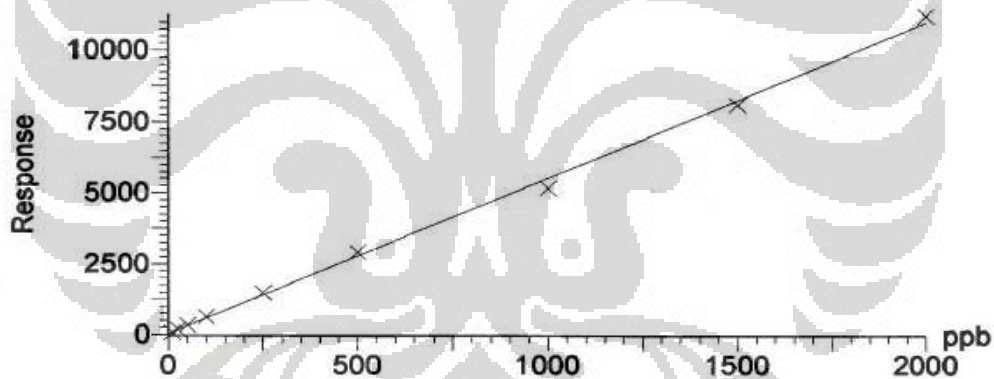
Persamaan garis : $Y = -36,597 * X + 11,75$



Lampiran 16. Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B₉ serta kromatogram standar dengan alat merk water

No	Konsentrasi Standar vitamin B ₉ (mg/L)	Respon relatif (Area)
1	10	77,962
2	25	175,42
3	50	336,488
4	100	624,656
5	250	1488,277
6	500	2918,901
7	1000	5170,999
8	1500	8110,845
9	2000	11236,117

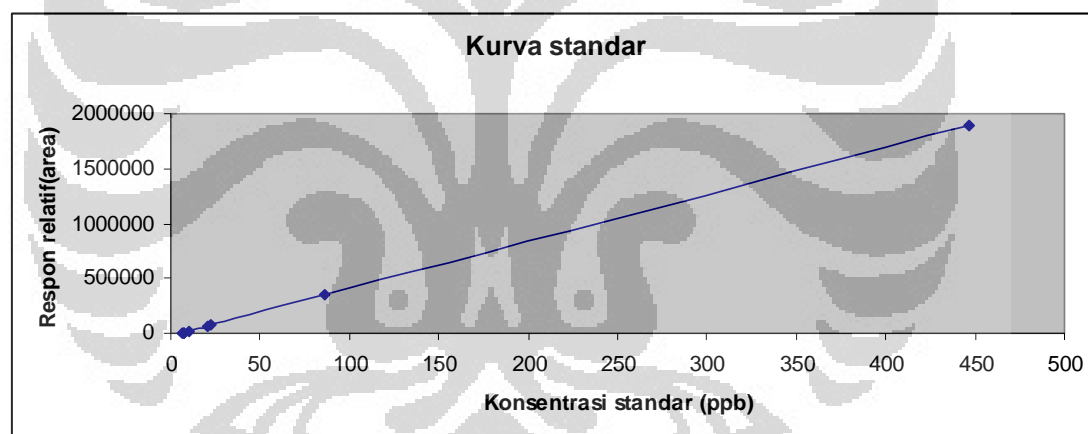
Persamaan garis : $Y = 40,159 * X + 5,4789$



Lampiran 17. Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B₁ dengan alat merk agilent

No	Konsentrasi Standar vitamin B ₁ (ppb)	Respon relatif (Area)
1	6,905	1163
2	7,2355	2532
3	7,292	2878
4	10,562	17045
5	20,1741	59216
6	22,7206	70536
7	86,2452	343950
8	446,4706	2E+06

Persamaan garis : $Y = 4306,996 * X - 28119,1878$

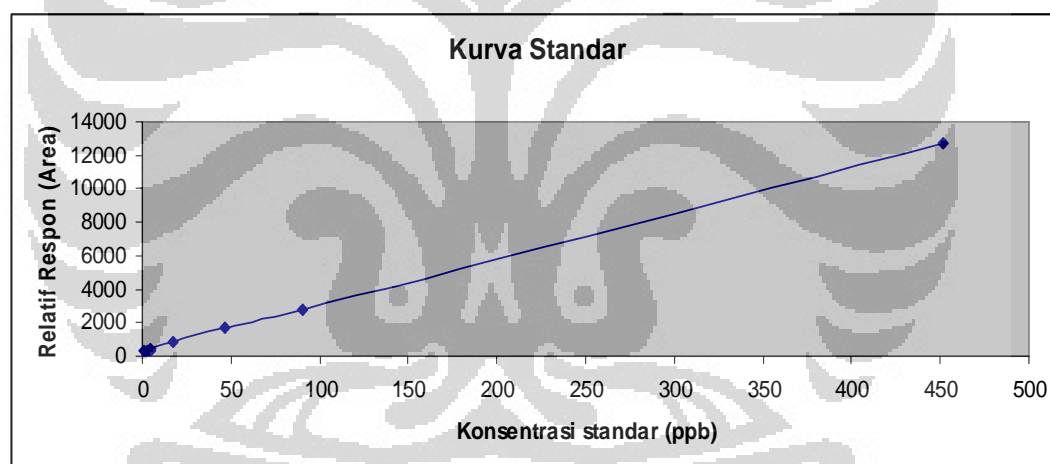


Multiple R 0,999999671
R Square 0,999999342

Lampiran 18. Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B₂ dengan alat merk agilent

No	Konsentrasi Standar vitamin B ₂ (ppb)	Respon relatif (Area)
1	1,2434	271
2	2,704	336
3	4,2535	352
4	4,7595	454
5	17,1724	877
6	46,4147	1666
7	89,9762	2812
8	452,0292	12741
9	1,2434	271

Persamaan garis : $Y = 27,5357 \cdot X + 309,588$

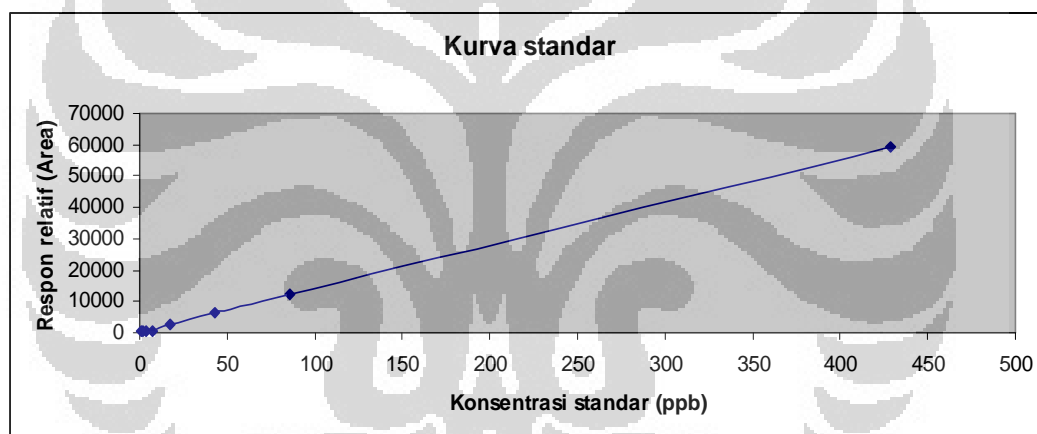


Multiple R 0,999884347
R Square 0,999768707

Lampiran 19. Data respon, konsentrasi dan kurva standar vitamin B₉ dengan alat merk agilent

No	Konsentrasi Standar vitamin B ₉ (ppb)	Respon relatif (Area)
1	0,549427	390
2	1,373568	705
3	3,43392	551
4	6,86784	748
5	17,1696	2490
6	42,924	6325
7	85,848	12024
8	429,24	59410

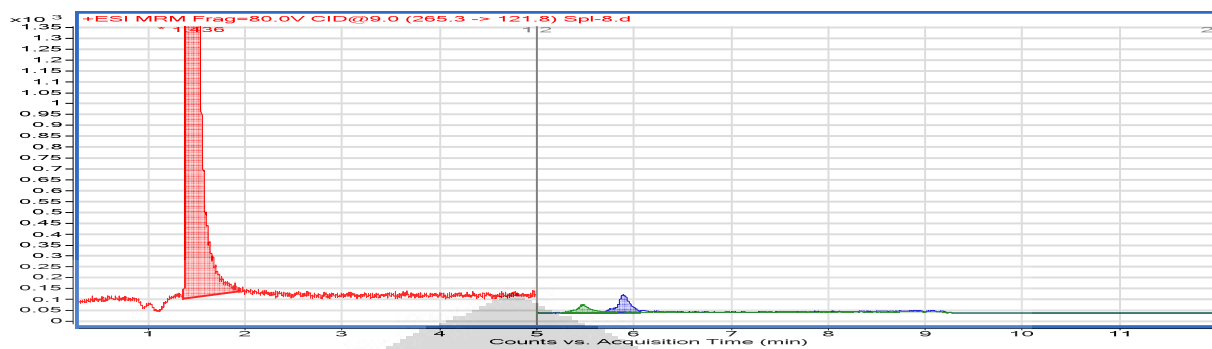
Persamaan garis : $Y = 137,955 \cdot X + 200,90$



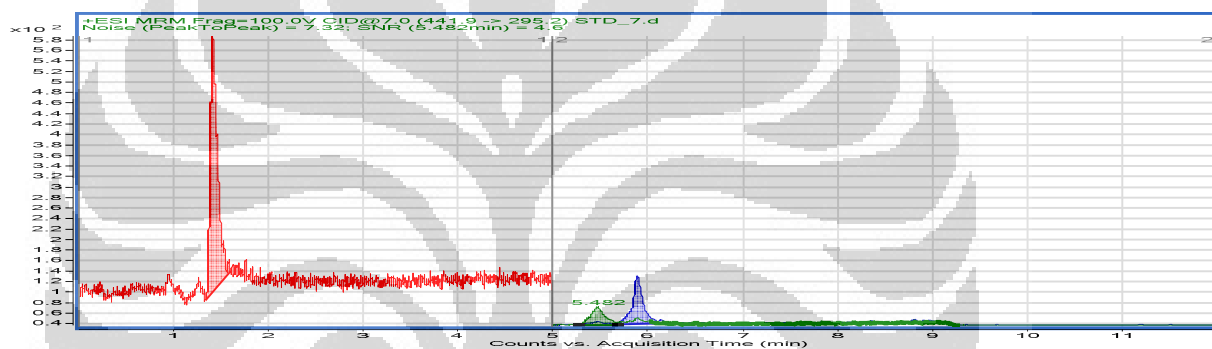
Multiple R 0,999941568
R Square 0,999883139

Lampiran 20 Kromatogram Deret Standar vitamin B₁, B₂, B₉

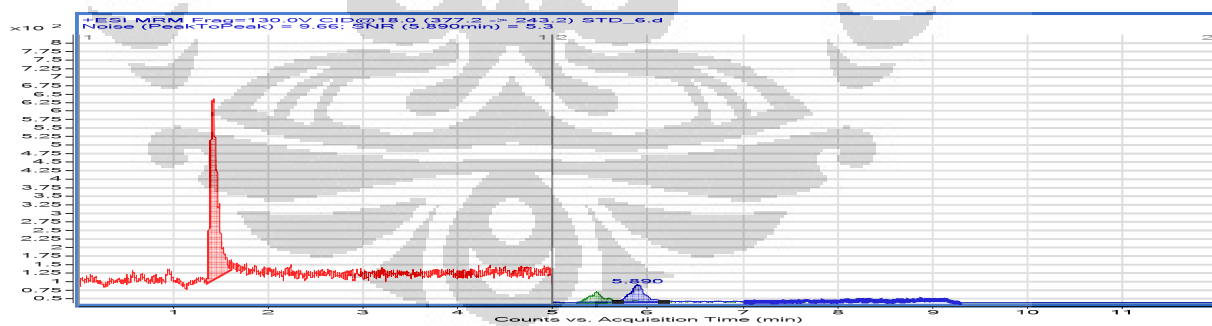
1. Standar 1



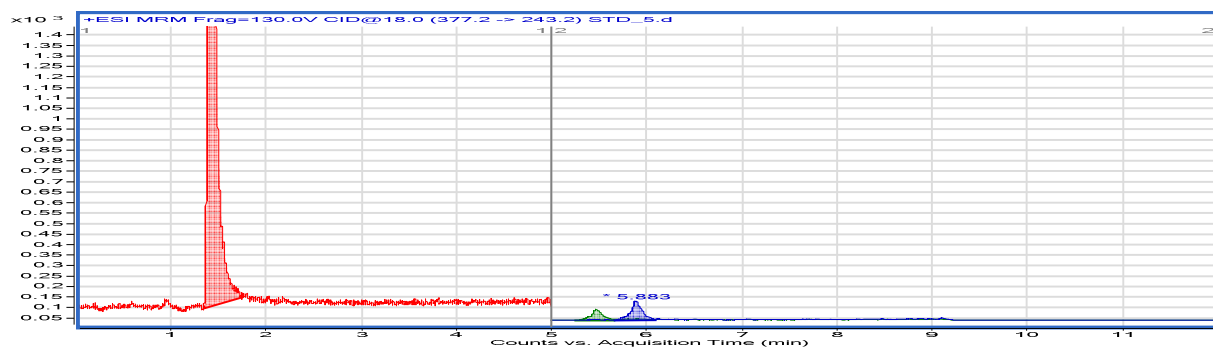
2. Standar 2



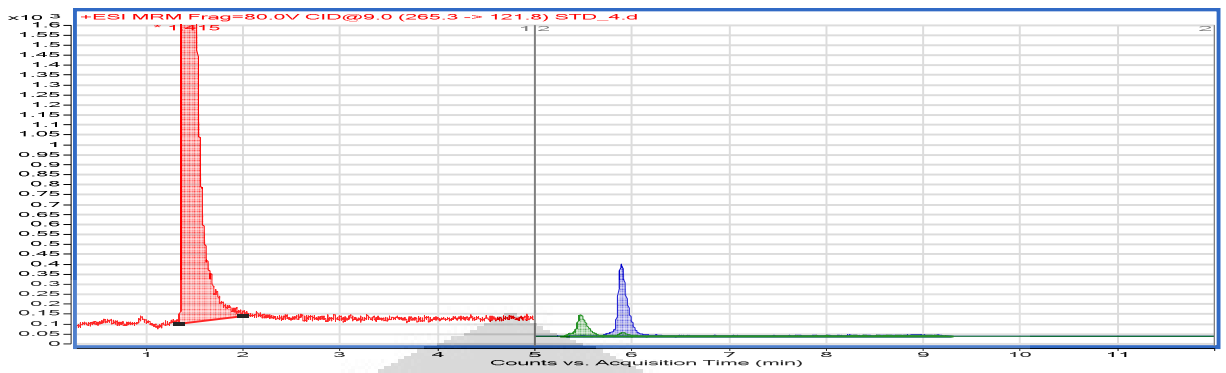
3. Standar 3.



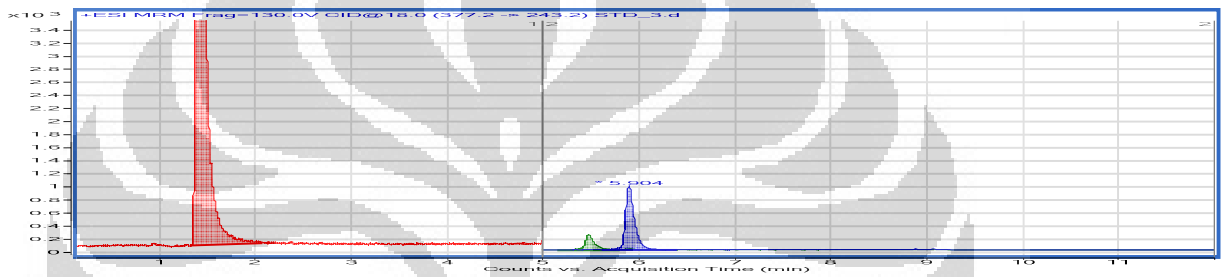
4. Standar 4.



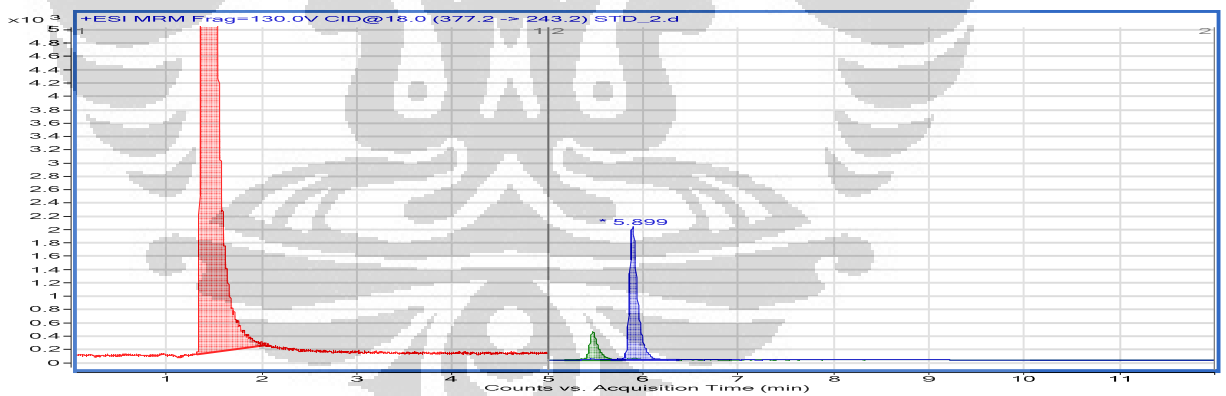
5. Standar 5



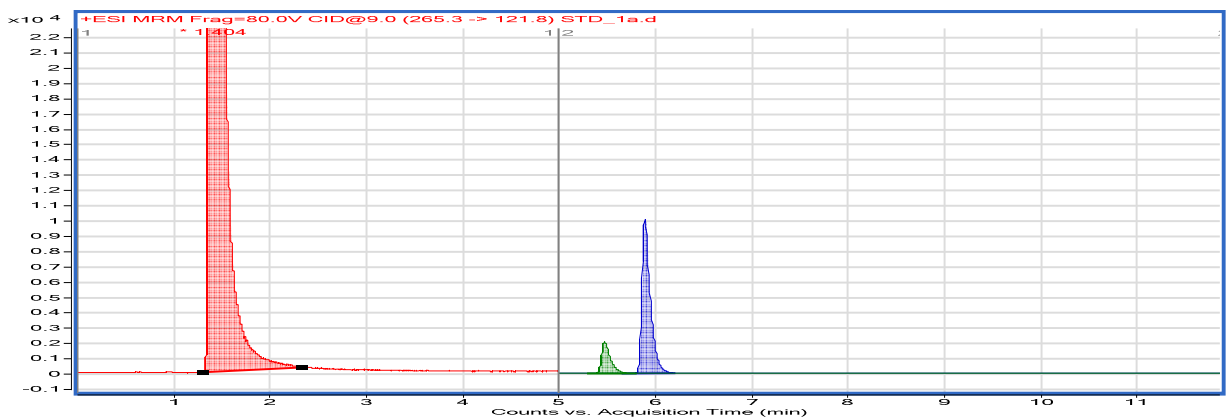
6. Standar 6



7. Standar 7



8. Standar 8



Lampiran 21, Perhitungan LOD dan LOQ berdasarkan kurva standar dengan alat merk agilent.

1, Vitamin B₁

Konsentrasi	Area	yi	yi-yi ²	Satuan
6,905	1163	1620,61958	209415,68	
7,2355	2532	3044,081758	262227,7269	
7,292	2878	3287,427032	167630,4945	
10,562	17045	17371,30395	106474,2691	
20,1741	59216	58770,5802	198398,795	
22,7206	70536	69738,34552	636252,6733	
86,2452	343950	343338,5436	373878,9056	
446,4706	1894679	1894827,901	22171,36414	
		Jumlah	1976449,909	
		bagi N-2	329408,3181	
		S(y/x)	573,9410406	
		LOD	0,39977356	ppb
			0,000399774	ppm
		LOQ	1,332578532	ppb
			0,001332579	ppm

2. Vitamin B₂

Konsentrasi	Area	yi	yi-yi ²	Satuan
1,2434	271	343,8258894	5303,610164	
2,704	336	384,0445328	2308,277132	
4,2535	352	426,7111	5581,748456	
4,7595	454	440,6441642	178,3783513	
17,1724	877	782,4420547	8941,205023	
46,4147	1666	1587,649255	6138,839275	
89,9762	2812	2787,14565	617,738697	
452,0292	12741	12756,52844	241,1325246	
		Jumlah	29310,92962	
		bagi N-2	4885,154937	
		S(y/x)	69,8938834	
		LOD	0,677292564	ppb
			0,000677293	ppm
		LOQ	2,257641879	ppb
			0,002257642	ppm

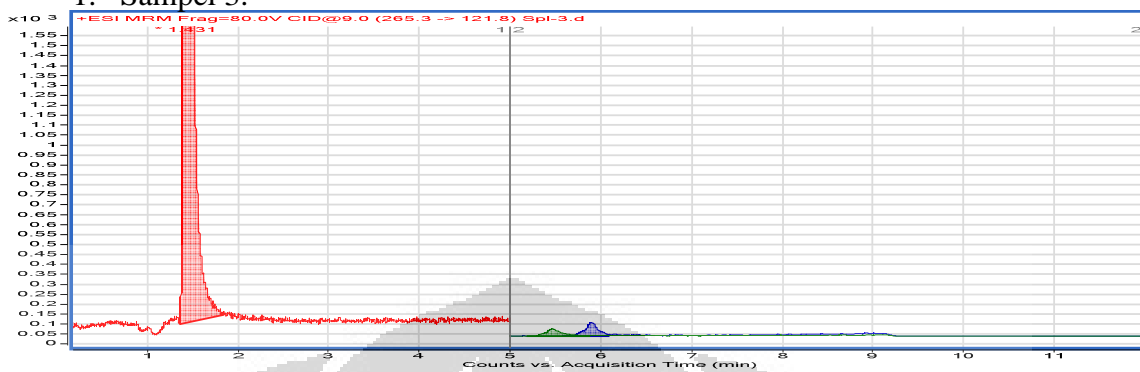
Lampiran 22, Perhitungan LOD dan LOQ berdasarkan kurva standar dengan alat merk agilent.

Vitamin B₉

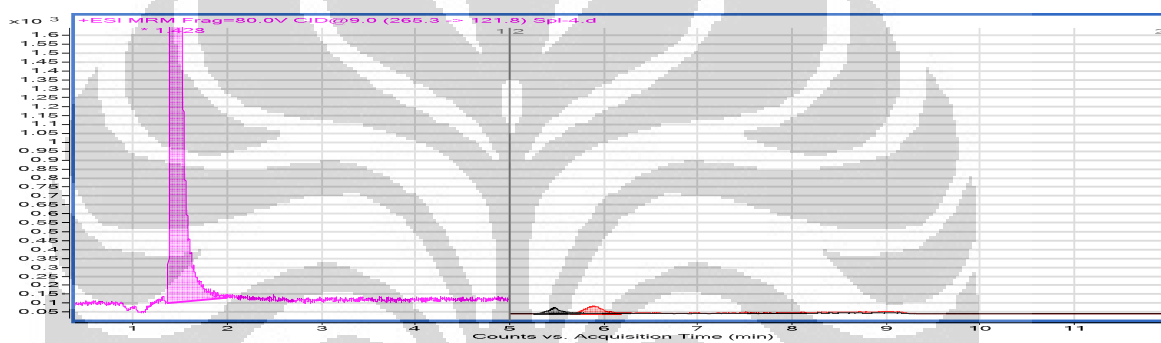
Konsentrasi	Area	yi	yi-yi ²	Satuan
0,549427	390	276,6962018	12837,75069	
1,373568	705	390,3905734	98979,09128	
3,43392	551	674,6264336	15283,49508	
6,86784	748	1148,352867	160282,4183	
17,1696	2490	2569,532168	6325,365747	
42,924	6325	6122,48042	41014,18028	
85,848	12024	12044,06084	402,4373015	
429,24	59410	59416,7042	44,94629764	
		Jumlah	335169,685	
		bagi N-2	55861,61416	
		S(y/x)	236,350617	
		LOD	3,529377058	ppb
			0,003529377	ppm
		LOQ	11,76459019	ppb
			0,01176459	ppm

Lampiran 23. Contoh Kromatogram sampel menggunakan alat LC-MS-MS merk agilent dan kolom Zorbax.

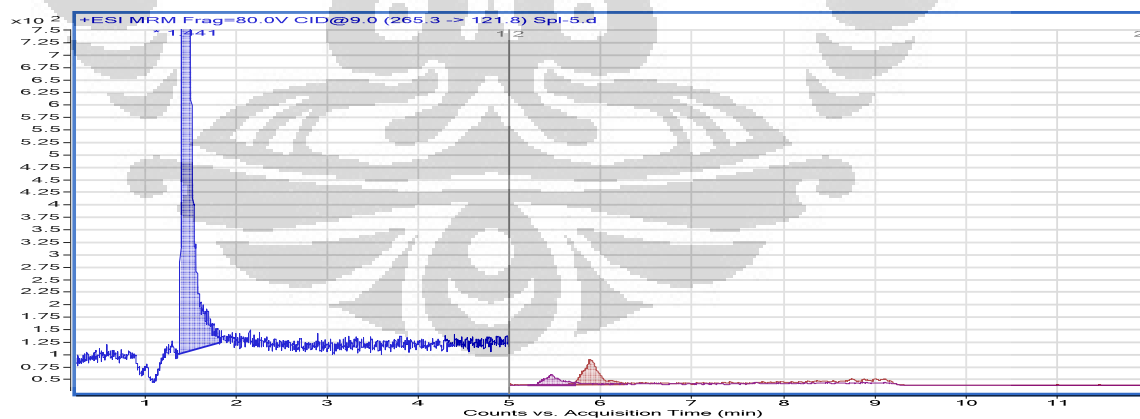
1. Sampel 3.



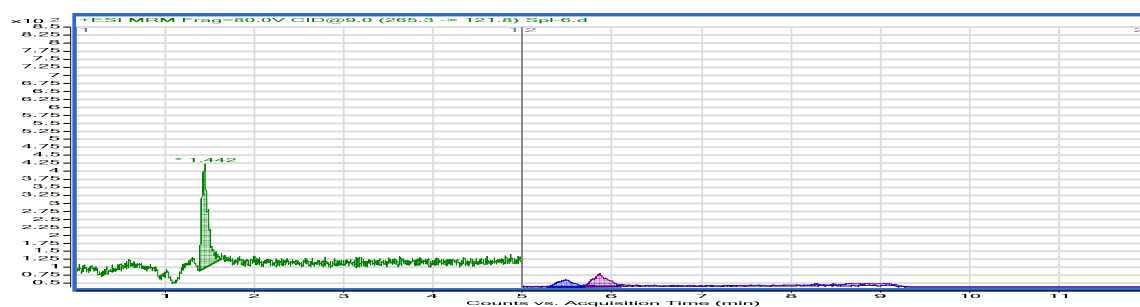
2. Sampel 4



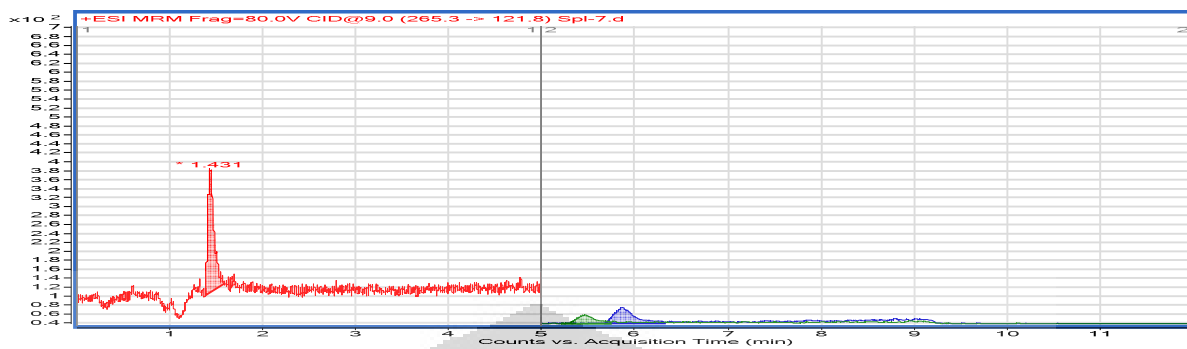
3. Sampel 5



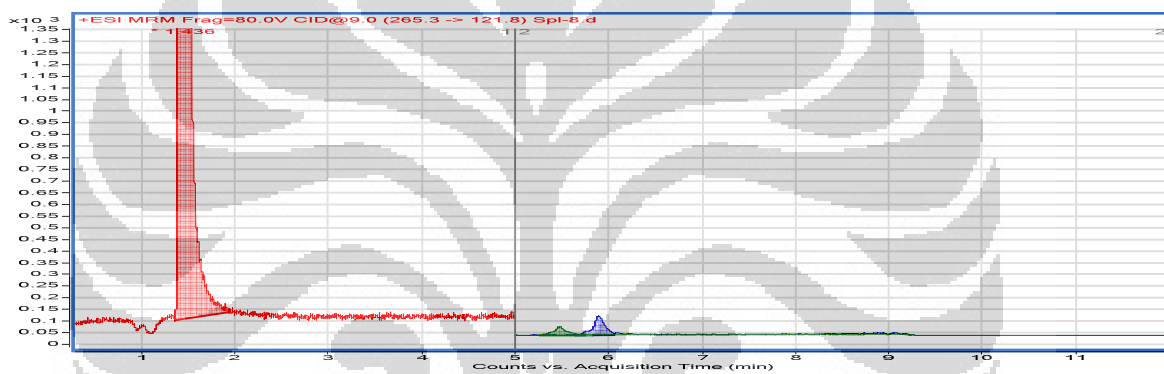
4. Sampel 6



5. Sampel 7



6. Sampel 8



Lampiran 24 : Hasil Pengujian Sampel (satuan ppm)

Kode Contoh	Vit.B ₁	Vit.B ₂	Vit B ₉	Rsd
1	0,3557	0,0944	0,0046	179,220
2	0,4212	0,1077	0,0835	
3	0,4182	0,0953	0,0819	2,402
4	0,2821	0,0976	0,0799	
5	0,3197	0,1139	0,0827	1,481
6	0,2992	0,0991	0,0815	
7	0,3420	0,0930	0,0801	2,523
8	0,3301	0,0921	0,0822	
9	0,1593	0,0788	0,0800	2,555
10	0,1377	0,0801	0,0821	
11	0,0881	0,0800	0,0815	0,299
12	0,0864	0,0786	0,0818	
13	0,3474	0,1041	0,0829	5,090
14	0,0788	0,0302	0,0788	
15	0,3749	0,0906	0,0826	0,302
16	0,3570	0,0957	0,0828	
17	0,4076	0,1077	0,0811	0,410
18	0,3665	0,0847	0,0807	
19	0,2308	0,0872	0,0798	1,365
20	0,0788	0,0302	0,0788	
21	0,3459	0,0932	0,0816	3,577
22	0,0788	0,0302	0,0788	
23	0,3891	0,0805	0,0818	0,371
24	0,3994	0,0779	0,0815	
25	0,3418	0,1016	0,0820	0,121
26	0,3193	0,0967	0,0819	
27	0,1448	0,0794	0,0800	0,109
28	0,1450	0,0773	0,0801	

29	0,3991	0,1027	0,0828	1,652
30	0,4164	0,0953	0,0814	
31	0,4211	0,1077	0,0832	1,871
32	0,3215	0,0881	0,0817	
33	0,3943	0,1065	0,0824	1,832
34	0,3633	0,0917	0,0809	
35	0,3043	0,0864	0,0817	0,457
36	0,3098	0,0946	0,0813	
37	0,3451	0,0866	0,0817	0,787
38	0,4097	0,0913	0,0824	
39	0,3019	0,0925	0,0812	-1,001
40	0,2689	0,0858	0,0804	
41	0,3687	0,0938	0,0822	0,653
42	0,3727	0,1010	0,0817	
43	0,2314	0,1713	0,1602	0,393
44	0,2266	0,1629	0,1596	
45	0,1612	0,1694	0,1592	0,102
46	0,1601	0,1557	0,1594	
47	0,1575	0,0605	0,1575	1,547
48	0,2489	0,1652	0,1600	
49	0,2177	0,1599	0,1590	0,139
50	0,1575	0,1629	0,1593	
51	0,2243	0,1637	0,1603	0,044
52	0,2154	0,1709	0,1604	
53	0,2204	0,1622	0,1599	0,182
54	0,2365	0,1576	0,1602	
55	0,1668	0,1717	0,1589	0,161
56	0,1575	0,1576	0,1591	
57	3,4607	0,1686	0,1598	0,131
58	0,2200	0,1660	0,1600	
59	0,1575	0,0605	0,1575	0,817

60	0,1586	0,1561	0,1588	
61	0,1575	0,0605	0,1575	0,926
61	0,1591	0,1561	0,1590	
63	0,2247	0,1686	0,1599	-0,036
64	0,3763	0,1595	0,1599	
65	0,2223	0,1690	0,1596	0,335
66	0,2310	0,1675	0,1602	
67	0,2476	0,1516	0,1598	0,095
68	0,2228	0,1709	0,1599	
69	0,2169	0,1622	0,1600	0,167
70	0,2194	0,1770	0,1598	
71	0,2079	0,1648	0,1597	0,292
72	0,2118	0,1603	0,1592	
73	0,2248	0,1656	0,1600	0,175
74	0,2212	0,1656	0,1597	
75	0,2270	0,1667	0,1597	0,087
76	0,2232	0,1645	0,1598	
77	0,2969	0,1584	0,1601	-0,015
78	0,2248	0,1683	0,1601	
79	0,2060	0,1648	0,1594	0,197
80	0,2078	0,1671	0,1597	
81	0,2309	0,1667	0,1598	0,036
82	0,2145	0,1622	0,1598	
83	0,2540	0,1641	0,1601	0,240
84	0,2533	0,1405	0,1598	
85	0,2908	0,1432	0,1599	0,457
86	0,2384	0,1755	0,1607	
87	0,2411	0,1610	0,1596	-0,022
88	0,2253	0,1622	0,1596	
89	0,2258	0,1595	0,1599	0,138
90	0,2080	0,1531	0,1601	

91	0,2429	0,1637	0,1597	0,204
92	0,2152	0,1641	0,1600	
92	0,1575	0,0605	0,1575	0,868
94	0,2021	0,1538	0,1589	
95	0,1575	0,0605	0,1575	0,000
96	0,1575	0,0605	0,1575	

