

**PENETAPAN KADAR VITAMIN C DAN TURUNANNYA DALAM
LARUTAN TOPIKAL SECARA KLT DENSITOMETRI**

RAFIKA SARI

0706197641



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI EKSTENSI
DEPOK
2010**

**PENETAPAN KADAR VITAMIN C DAN TURUNANNYA DALAM LARUTAN
TOPIKAL SECARA KLT DENSITOMETRI**

Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana

Farmasi

Oleh :

RAFIKA SARI

0706197641



DEPOK

2010

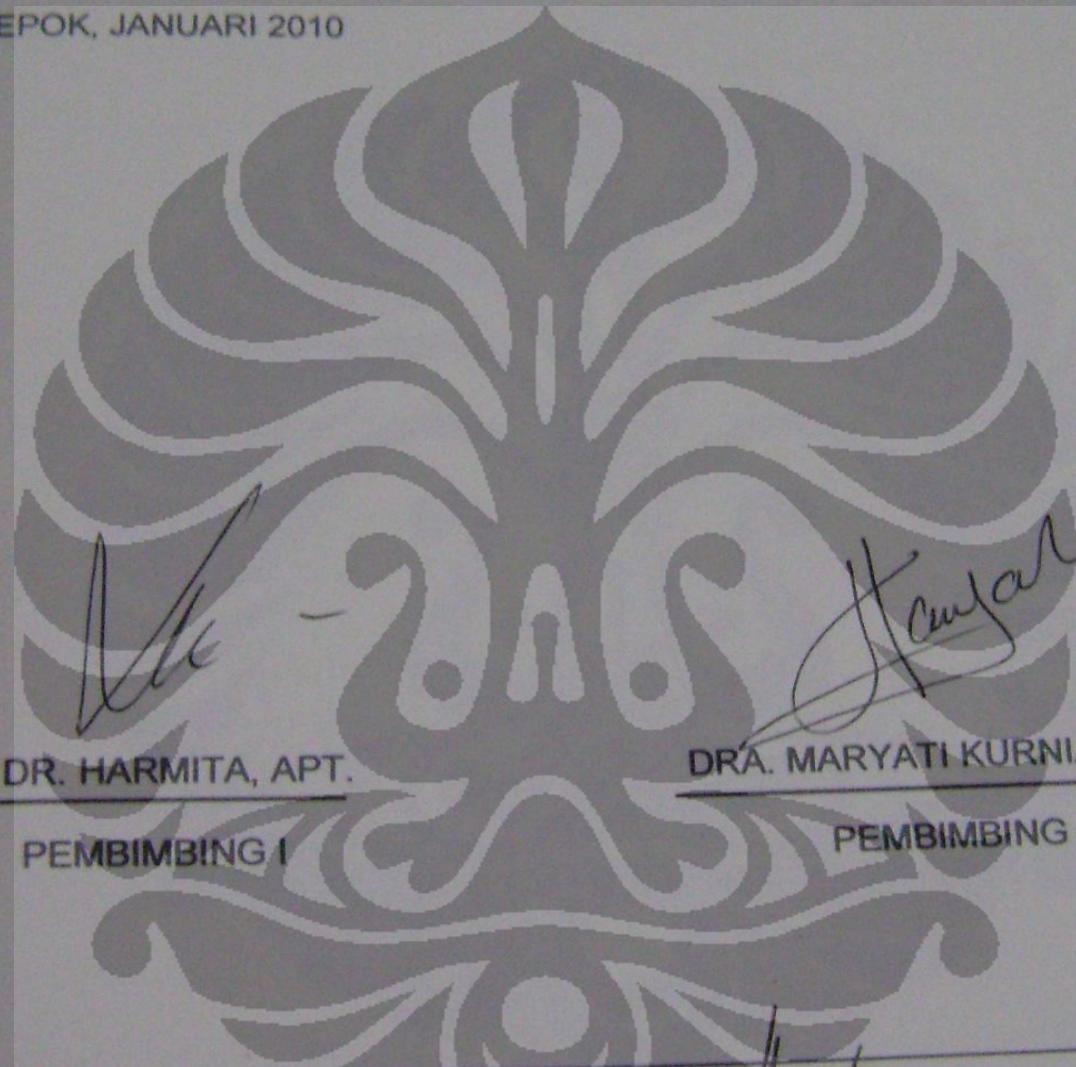
SKRIPSI : PENETAPAN KADAR VITAMIN C DAN TURUNANNYA DALAM
LARUTAN TOPIKAL SECARA KLT DENSITOMETRI

NAMA : RAFIKA SARI

NPM : 0706197641

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JANUARI 2010



Tanggal lulus ujian Sidang Sarjana : .ll - 01 - 2010

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

Pengaji II : Sutriyo S.Si., M.Si., Apt.....

Pengaji III : Prof. Dr. Atiek Soemiatyi M.S.....

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada sumber segala kebenaran dan ilmu pengetahuan, Allah SWT, karena atas segala rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi ini.

Skripsi yang berjudul Penetapan Kadar Vitamin C dan Turunannya dalam Larutan Topikal secara KLT Densitometri ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi, Departemen Farmasi Universitas Indonesia. Penelitian dalam rangka penyusunan skripsi ini dilakukan sepenuhnya di Laboratorium Kimia Kuantitatif, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis hendak mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Harmita, Apt. selaku pembimbing I dan Ibu Dra. Maryati Kurniadi, MSi selaku pembimbing II yang telah bersedia memberikan bimbingan dan pengarahan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku ketua Departemen Farmasi UI.
3. Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.Si, selaku Ketua Pogram Sarjana Ekstensi yang telah memberikan bantuan untuk kelancaran skripsi ini.
4. Ibu Santi Purna Sari S.Si., M.Si, selaku pembimbing akademik yang telah memberikan nasihat dan bimbingan.

5. Bapak Drs. Hayun, Msi, selaku kepala Laboratorium Kimia Kuantitatif Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah mengizinkan penulis menggunakan ruang dan fasilitas laboratorium selama penelitian.
6. Ayah, Ibu, Wenni dan Puput yang selalu memberikan doa, kasih sayang dan dukungan moril serta materiil sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
7. Para karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu terlaksananya penelitian ini, khususnya Pak Rustam, atas segala bantuannya di Laboratorium Kimia Kuantitatif.
8. Teman-teman Farmasi Ekstensi 2007, khususnya teman-teman di Laboratorium Kimia Kuantitatif, Dj, Fabel, Koba, Galih, Fitri, Angel, Anyu, Kak Ingga, Kak Deffi, Mbak Puji, Tika yang telah memberikan bantuan selama penelitian.
9. Sahabatku (Teh Yuli, Ica, Kak Reni, Mbak restu, Erin dan Uci) yang telah memberikan semangat dan dukungan serta keceriaan.

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

Depok, 2009

Penulis

ABSTRAK

Vitamin C digunakan untuk mencegah penuaan dini, pembentukan melanin dan merangsang pembentukan kolagen. Vitamin C dibuat dalam sediaan topikal agar dapat langsung diaplikasikan pada kulit seperti bentuk larutan. Akan tetapi dalam bentuk larutan, vitamin C tidak stabil karena mudah teroksidasi sehingga efektifitasnya berkurang. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode analisis dan menetapkan kadar vitamin C dan turunannya dalam sampel dengan KLT densitometri menggunakan fase diam silika gel 60 F 254 dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (5:1:1). Deteksi dilakukan menggunakan Camag *TLC Scanner 3* pada panjang gelombang 266 nm. Hasil pengujian menunjukkan bahwa batas deteksi dan batas kuantitasi vitamin C, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter memenuhi persyaratan karena dibawah konsentrasi terkecil dari kurva kalibrasi. Hasil uji keterulangan vitamin C, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter memberikan nilai koefisien variasi $\leq 2\%$ sedangkan magnesium askorbil fosfat memberikan nilai koefisien variasi lebih dari 2%. Hasil uji perolehan kembali vitamin C dan natrium askorbil fosfat berturut-turut adalah $(99,98 \pm 1,909)\%$ dan $(84,94 \pm 1,533)\%$. Hasil analisis menunjukkan bahwa pada sampel A mengandung vitamin C sebesar 8,62%, dalam sampel B mengandung natrium askorbil fosfat dengan sebesar 7,62% dan dalam sampel C tidak ditemukan vitamin C maupun turunannya.

Kata kunci : vitamin C, turunan vitamin C, KLT densitometri

xiii + 100 hlm; gambar; tabel; lampiran

Bibliografi : 32 (1969-2009)



ABSTRACT

Vitamin C is used to aging and prevent melanin formation and also stimulate collagen formation. Vitamin C was formulation in topical dosage form to apply easily to the skin was like solution. Nevertheless in solution, vitamin C could be oxidation so its effectiveness was less. The purposes of this research were determined analysis method and the level of vitamin C and its derivates in samples by TLC scanner using silica gel 60 F 254 as stationary phase, with butanol-acetic acid-water (5:1:1) as mobile phase. Detection was using Camag *TLC Scanner 3* at 266nm. The result showed that the limit of detection and the limit of quantitation of vitamin C, magnesium ascorbyl phosphate, sodium ascorbyl phosphate, ascorbyl glucoside and ethyl ascorbyl ether were suitable with the requirement because under the lowest concentration of calibration curve. The result of vitamin C, sodium ascorbyl phosphate, ascorbyl glucoside and ethyl ascorbyl ether repeatability have coeffisien variation $\leq 2\%$, while magnesium ascorbyl phosphate repeatability has coeffisien variation more than 2%. The accuration of vitamin C and sodium ascorbyl phosphate were $(99,98 \pm 1,909)\%$ and $(84,94 \pm 1,533)\%$ respectively. The result of analysis showed that in sample A the average concentration of vitamin C was 8,62%, sodium ascorbyl phosphate in sample B was 7,62% and in sample C did not detect vitamin C or its derivates.

Keyword : ascorbic acid, ascorbic acid derivates, TLC scanner

xiii + 100 pages; pictures; tables; appendixes

Bibliography : 32 (1969-2009)



DAFTAR ISI

Halaman

KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Asam Askorbat	3
B. Askorbil Fosfat	15
C. Askorbil Glukosida	19
D. Etil Askorbil Eter	20
E. Kromatografi Lapis Tipis	21
F. Validasi Metode Analisis	31
BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA	
A. Lokasi	38

B.	Bahan.....	38
C.	Alat.....	38
D.	Optimasi dan Validasi Metode Analisis Vitamin C dan Turunannya Secara KLT Densitometri	39

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A.	Hasil	45
B.	Pembahasan	49

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

A.	Kesimpulan	54
B.	Saran.....	54

DAFTAR ACUAN	55
--------------------	----

DAFTAR GAMBAR

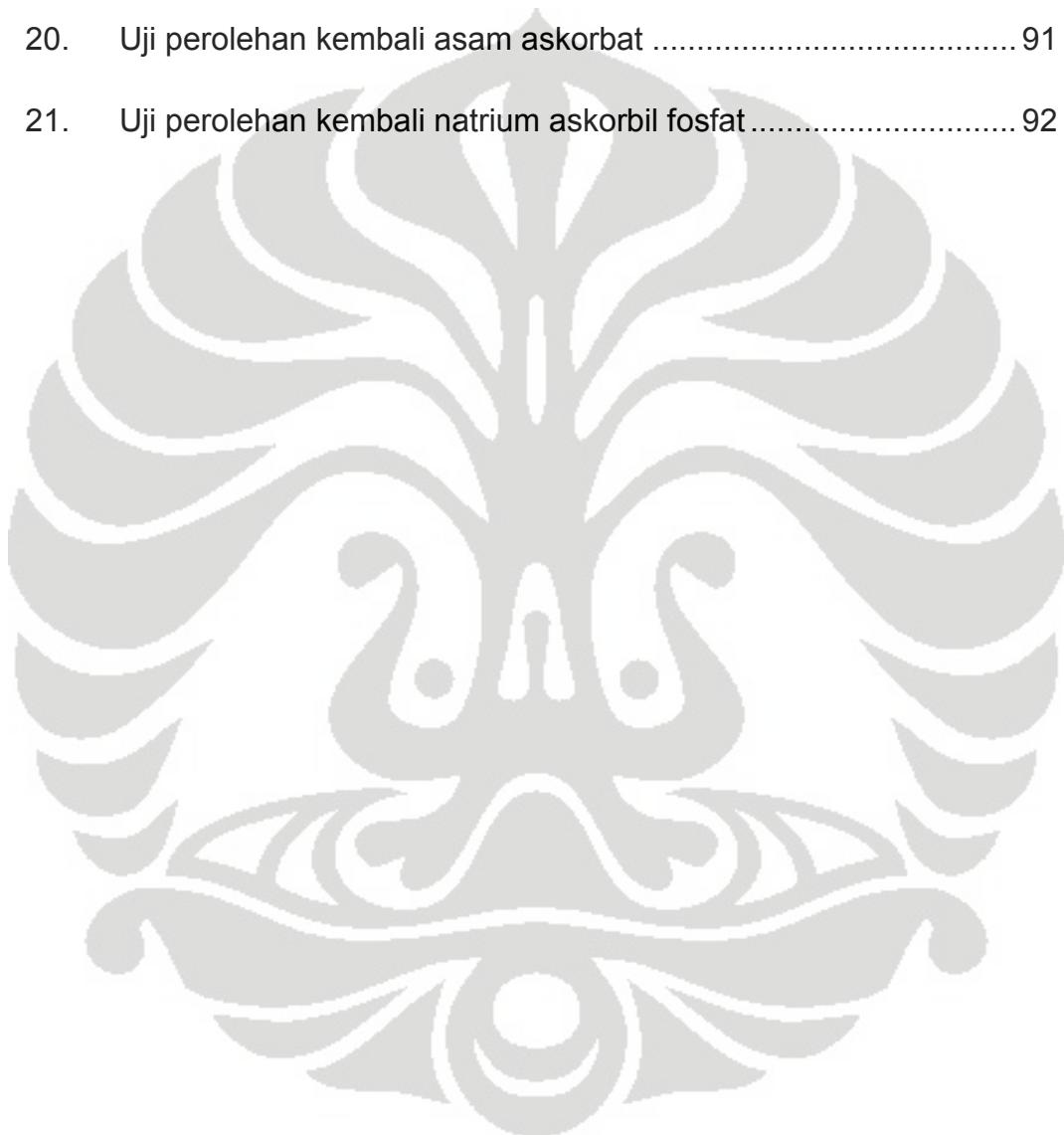
Gambar	Halaman
1. Rumus bangun asam askorbat.....	3
2. Sintesis asam askorbat.....	5
3. Degradasi asam askorbat secara aerob	6
4. Degradasi asam askorbat pada kondisi anaerob	7
5. Rumus bangun magnesium askorbil fosfat.....	16
6. Rumus bangun natrium askorbil fosfat.....	17
7. Rumus bangun askorbil glukosida	19
8. Rumus bangun etil askorbil eter	20
9. Spektrum serapan menggunakan spektrofotometer uv-vis.....	58
10. Spektrum serapan menggunakan TLC Scanner.....	59
11. Densitogram asam askorbat ,magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter.....	60
12. Kurva kalibrasi asam askorbat.....	61
13. Kurva kalibrasi magnesium askorbil fosfat.....	61
14. Kurva kalibrasi natrium askorbil fosfat	62
15. Kurva kalibrasi askorbil glukosida.....	62
16. Kurva kalibrasi etil askorbil eter	63
17. Kurva kalibrasi asam askorbat dalam matriks	64

18.	Kurva kalibrasi natrium askorbil fosfat dalam matriks	64
19.	Spektrum serapan sampel dan standar asam askorbat	65
20.	Spektrum serapan sampel dan standar natrium askorbil fosfat.....	66
21.	Spektrum serapan sampel dan standar magnesium askorbil fosfat .	66
22.	Densitogram sampel A yang mengandung asam askorbat	67
23.	Densitogram sampel B yang mengandung natrium askorbil fosfat..	67
24.	Densitogram sampel C.....	68
25.	Densitogram dehidroaskorbat	68
26.	Densitogram uji perolehan kembali asam askorbat konsentrasi rendah, sedang dan tinggi	69
27.	Densitogram uji perolehan kembali natrium askorbil fosfat konsentrasi rendah, sedang dan tinggi	70
28.	Alat TLC scanner 3 (Camag) beserta komputer yang dilengkapi program winCATS	71
29.	Sampel yang digunakan.....	72

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Beberapa penjerap fase diam yang digunakan pada KLT	25
2. Kurva kalibrasi dan linearitas asam askorbat	73
3. Batas deteksi dan batas kuantitasi asam askorbat.....	74
4. Uji keterulangan asam askorbat	75
5. Kurva kalibrasi dan linearitas magnesium askorbil fosfat	76
6. Batas deteksi dan batas kuantitasi magnesium askorbil fosfat....	77
7. Uji keterulangan magnesium askorbil fosfat	78
8. Kurva kalibrasi dan linearitas natrium askorbil fosfat.....	79
9. Batas deteksi dan batas kuantitasi natrium askorbil fosfat	80
10. Uji keterulangan natrium askorbil fosfat.....	81
11. Kurva kalibrasi dan linearitas askorbil glukosida	82
12. Batas deteksi dan batas kuantitasi askorbil glukosida	83
13. Uji keterulangan askorbil glukosida	84
14. Kurva kalibrasi dan linearitas etil askorbil eter	85
15. Batas deteksi dan batas kuantitasi etil askorbil eter	86
16. Uji keterulangan etil askorbil eter.....	87
17. Penetapan kadar sampel.....	88

18. Kurva kalibrasi, batas deteksi dan batas kuantitasi asam askorbat dalam matriks	89
19. Kurva kalibrasi, batas deteksi dan batas kuantitasi natrium askorbil fosfat dalam matriks	90
20. Uji perolehan kembali asam askorbat	91
21. Uji perolehan kembali natrium askorbil fosfat	92



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan kurva kalibrasi	93
2. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitas	94
3. Perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi.....	95
4. Perhitungan uji perolehan kembali	96
5. Perhitungan kadar sampel.....	97
6. Sertifikat analisis asam askorbat	98
7. Sertifikat analisis magnesium askorbil fosfat	99
8. Sertifikat analisis natrium askorbil fosfat.....	100

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Vitamin C digunakan untuk mencegah penuaan dini dan pembentukan melanin serta merangsang pembentukan kolagen (1). Penggunaan vitamin C secara oral membutuhkan dosis yang tinggi karena mengalami absorbsi yang lama melewati organ seperti lambung dan usus. Sedangkan jika vitamin C diberikan secara topikal, akan langsung berpenetrasi ke kulit. Oleh karena itu, dibuat sediaan topikal agar memberikan efek yang lebih cepat (2).

Salah satu bentuk sediaan topikal dari vitamin C adalah larutan. Akan tetapi vitamin C tidak stabil karena mudah teroksidasi sehingga dibuat produk vitamin C yang lebih stabil yaitu dengan menggunakan turunan vitamin C (3).

Turunan vitamin C lebih stabil dan tidak terlalu mengiritasi dibandingkan vitamin C (4). Beberapa turunan vitamin C yang sering digunakan yaitu natrium askorbat fosfat, magnesium askorbat fosfat, askorbat glukosida dan etil askorbat eter. Saat digunakan, turunan vitamin C ini akan diubah oleh enzim fosfatase menjadi vitamin C. Walaupun turunan vitamin C ini lebih stabil, tetapi ada kemungkinan terjadinya hidrolisis yang menyebabkan turunan vitamin C berubah menjadi vitamin C. Sehingga perlu

dilakukan penetapan kadar terhadap turunan vitamin C dalam sediaan topikal.

Metode analisis kuantitatif yang dapat digunakan adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Dengan KCKT, pemisahan cukup baik tetapi biaya operasional yang diperlukan cukup mahal. Sedangkan dengan metode KLT dibutuhkan peralatan dan metode yang lebih sederhana, waktu analisis relatif cepat dan biaya operasional yang lebih murah (5,6,7,8,9).

Telah dilakukan penelitian terhadap kadar askorbil fosfat dan asam askorbat dalam larutan topikal vitamin C secara KLT densitometri (6). Akan tetapi, pemisahan yang terjadi kurang baik. Oleh karena itu, dilakukan penelitian terhadap empat turunan vitamin C yaitu natrium askorbil fosfat, magnesium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter secara KLT densitometri untuk mendapatkan pemisahan yang baik sehingga kadar yang didapat lebih akurat.

B. Tujuan Penelitian

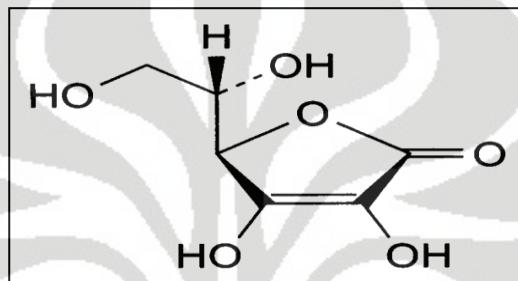
1. Optimasi metode analisis vitamin C dan turunannya dalam larutan topikal secara KLT densitometri.
2. Menetapkan kadar vitamin C dan turunannya dalam sampel.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Vitamin C

1. Monografi (10,11)



Gambar 1. Struktur vitamin C (12)

Vitamin C mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 100,5%

$C_6H_8O_6$.

Rumus Molekul : $C_6H_8O_6$

Bobot Molekul : 176,13

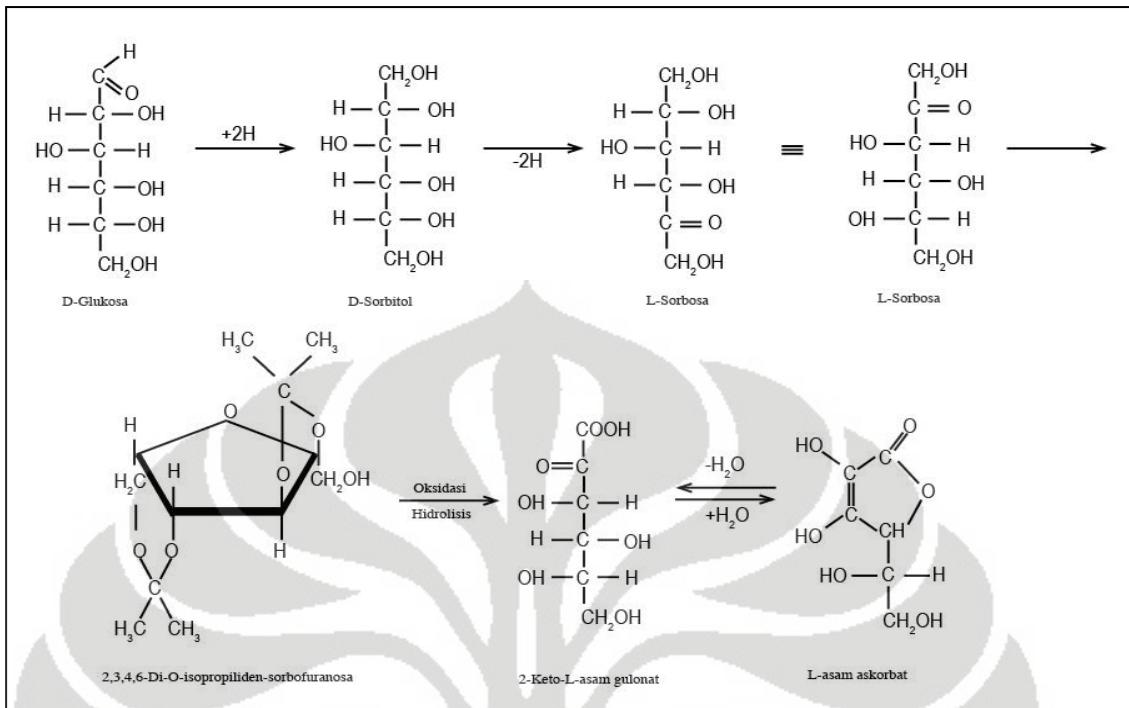
Sinonim : Vitamin C

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

Kelarutan	: Larut dalam 3,5 bagian air, dalam 25 bagian alkohol, dan dalam 10 bagian metil alkohol; tidak larut dalam eter, kloroform dan benzen.
Keasaman	: Larutan 5% memiliki pH antara 2,2 – 2,5
Suhu lebur	: Lebih kurang 190°C

2. Sintesis vitamin C

Sintesis vitamin C berawal dari d-glukosa. Pertama, d-glukosa terhidrogenasi menjadi d-sorbitol yang kemudian mengalami dehidrogenasi menggunakan *acetobacter* menjadi l-sorbosa. l-sorbosa dioksidasi menjadi 2-keto-l- asam gulonat, baik secara langsung menggunakan oksigen dan platinum katalis, atau dengan turunan di-isopropylidene dan kalium permanganate. Kemudian asam 2-keto -l-asam gulonat dipanaskan dengan asam encer, dan menjadi l-asam askorbat (13).



Gambar 2. Sintesis vitamin C (13)

3. Fungsi Vitamin C

Vitamin C dalam sediaan kosmetik dapat melindungi kulit terhadap UV akibat radikal bebas yang menyebabkan penuaan kulit. Selain itu, vitamin C juga dapat menghambat oksidasi DOPA sehingga menghambat pembentukan eumelanin yang menyebabkan kulit menjadi lebih gelap (1).

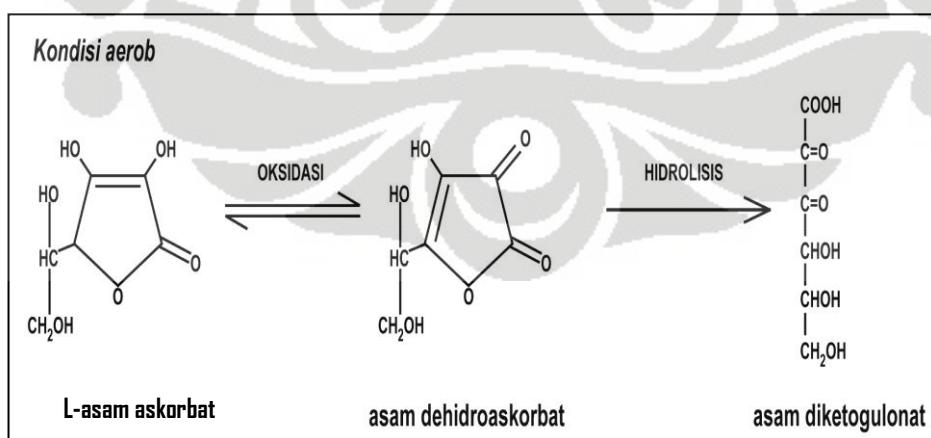
Vitamin C juga berperan sebagai kofaktor dalam sejumlah reaksi hidrosilasi dengan memindahkan elektron ke ion logam dari suatu enzim yang harus berada dalam keadaan tereduksi. Salah satu contohnya adalah vitamin C mempercepat perubahan residu prolin dan lisin pada prokolagen

menjadi hidroksiprolin dan hidroksilisin pada sintesis kolagen, yaitu protein bahan penunjang utama dalam tulang rawan dan jaringan ikat. Bila sintesis kolagen terganggu, maka mudah terjadi kerusakan pada dinding pembuluh yang berakibat perdarahan (14).

4. Stabilitas larutan vitamin C (3)

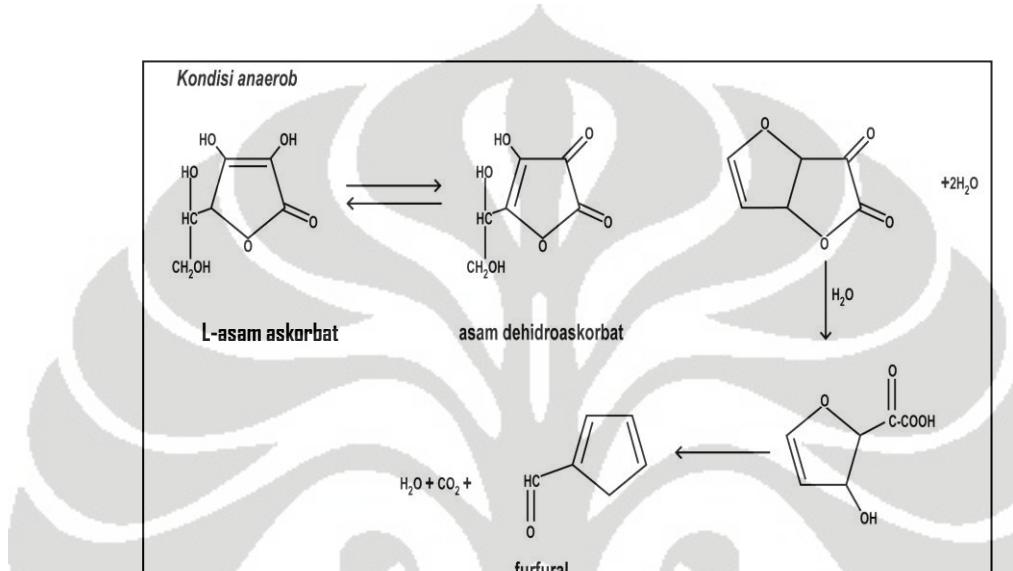
Vitamin C sangat tidak stabil dalam bentuk larutan. Larutan vitamin C (vitamin C) mudah teroksidasi oleh udara. Oksidasi dapat dipercepat dengan adanya cahaya, panas, basa dan ion logam terutama Cu^{2+} dan Fe^{3+} .

Degradasi vitamin C dapat terjadi pada kondisi aerob dan anaerob. Pada kondisi aerob, vitamin C akan teroksidasi menjadi asam dehidroaskorbat dan reaksi ini bersifat reversibel. Asam dehidroaskorbat ini dapat mengalami hidrolisis yang bersifat irreversibel menjadi asam 2,3-diketogulonat dan kemudian teroksidasi menjadi asam oksalat yang sudah tidak memiliki aktivitas antiskorbut.



Gambar 3. Degradasi vitamin C secara aerob (3)

Sedangkan pada kondisi anaerob, vitamin C akan mengalami dehidrasi dan hidrolisis menghasilkan furfural dan karbondioksida . Pada keadaan anaerob, kecepatan oksidasi vitamin C mencapai maksimum pada pH 4 dan menurun sampai mencapai minimum pH 2 (15).



Gambar 4. Degradasi vitamin C pada kondisi anaerob (3)

5. Metode analisis vitamin C

a. Metode Fisik (15,16)

1. Metode Spektrofotometri

Metode ini berdasarkan pada kemampuan vitamin C yang terlarut dalam air untuk menyerap sinar ultraviolet. Karena vitamin C dalam larutan

mudah sekali mengalami kerusakan, maka pengukuran dengan cara ini harus dilakukan secepat mungkin. dari vitamin C.

a. Diazotisasi dengan 4-metoksi-2-nitroanilin

Dalam larutan alkali akan memberikan warna biru dengan λ maksimum 570 nm. Reaksi ini sangat spesifik untuk vitamin C yang disertai asam dehidroaskorbat dan vitamin lain yang terdapat dalam sediaan farmasi.

b. Diazotisasi dengan p-Nitroanilin

Diazotasi p-nitroanilin dengan vitamin C menjadi bentuk phenylhidrazid. Penambahan natrium hidroksida menghasilkan bentuk garam dinatrium yang berwarna oranye yang memberikan λ maksimum 480 nm.

c. Spektrofotometri dengan potassium ferisianida

Reaksi vitamin C dengan potassium ferisianida terjadi pada pH 3,5. Ion ferisianida yang dihasilkan akan diubah menjadi ion ferro yang direaksikan dengan 1,10-fenantrolin untuk menghasilkan kompleks berwarna merah yang memberikan λ maksimum 510 nm.

2. Metode Polarografik

Metode ini berdasarkan pada potensial oksidasi vitamin C dalam larutan asam atau bahan pangan yang bersifat asam, misalnya ekstrak buah-buahan dan sayuran.

- a) Polarografik dengan Buffer pH 8
 - b) Polarografik dengan Buffer pH 5,2
- b. Metode Kimia(7,16)

1. Titrasi

a. Titrasi dengan 2,6-diklorofenol indofenol

Larutan vitamin C akan teroksidasi menjadi asam dehidroaskorbat dengan penambahan larutan 2,6-diklorofenol indofenol. Setelah semua larutan vitamin C teroksidasi, kelebihan 2,6-diklorofenol indofenol akan memberikan warna merah muda pada larutan.

b. Titrasi dengan N-bromosuksinimid

Vitamin C akan dioksidasi oleh N-bromosuksinimid, kemudian ditambahkan kalium iodida dan beberapa tetes pasta kanji. Larutan vitamin C dioksidasi dan kelebihan N-bromosuksinimid akan melepaskan iodium dari kalium iodida yang akan berwarna biru dengan adanya pasta kanji.

c. Titrasi dengan Natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat

Dalam medium asam, natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat yang berwarna oranye akan direduksi oleh vitamin C menjadi komponen yang tidak berwarna. natrium 1,2-naftoquinon-4-sulfonat lebih menguntungkan daripada 2,6-diklorofenol indofenol karena berbentuk kristal yang lebih larut dalam air dingin dan tidak perlu distandarisasi.

2. Kolorimetri

a. Dengan asam 3,4-dinitrobenzoat

Vitamin C akan memberikan warna kuning dengan asam 3,4-dinitrobenzoat yang memiliki λ maksimum 415 nm.

b. Dengan 2,3,5-trifeniltetrazolium klorida

Larutan 2,3,5-trifeniltetrazolium klorida akan memberikan warna pink dengan vitamin C dalam suasana basa.

c. Dengan kompleks fosfomolibdat

Berdasarkan reduksi kompleks fosfomolibdat oleh vitamin C yang akan membentuk kompleks molybdenum yang berwarna biru.

3. Spektrofluorometri

Vitamin C dioksidasi menjadi dehidroaskorbat dengan penambahan karbon aktif. Bentuk teroksidasinya direaksikan dengan o-fenilendiamin yang akan membentuk senyawa kompleks yang berfluoresensi pada panjang gelombang eksitasi minimum 350 nm dan panjang gelombang emisi maksimum 430 nm.

4. Reduksi dengan 2,4-dinitrofenil hidrazin

Berdasarkan reaksi oksidasi vitamin C menjadi asam dehidroaskorbat, kemudian perubahan asam dehidroaskorbat menjadi asam diketogulonat,

yang akan dikopling dengan 2,4-dinitrofenil hidrazin dan memberikan warna merah osazon. Metode ini digunakan untuk menentukan kadar total vitamin C.

5. Kromatografi Kertas

Vitamin C dipisahkan dari zat pereduksi lain menggunakan kromatografi kertas. Bercak yang dihasilkan dipotong dan warna dari bercak dielusi dengan aqua destillata. Larutan kemudian ditetapkan kadarnya dengan metode kolorimetri.

Fase Gerak : butanol-asam asetat-air = (4:1:5)

Deteksi : 1. 2,2'-bipiridil 0,2% dalam kloroform

2. Seri klorida 0,1% dalam HCl 0,5%.

6. Kromatografi Gas

Dalam sediaan vitamin C, L-asam askorbat dan natrium L-asam askorbat ditetapkan sebagai turunan trimetilsilyl. Dengan fase diam SE-52 5% dalam silanized 'Celite' 545, dengan mesh 60-80 dan temperatur kolom 210°C .

7. Teknik pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis

- Penetapan Kadar Askorbil Fosfat dan Asam Askorbat dalam Larutan Topikal Vitamin C secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri (6)

Fase Diam : Lempeng silika gel 60F 254

Fase Gerak : metanol-air = (85:17)

Deteksi : KLT densitometri pada λ 244 nm

- b. Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Kadar Vitamin C dalam Minuman Suplemen (8)

Fase Diam : Lempeng silika gel 60F 254

Fase Gerak : etanol-asam asetat 10% = (90:10)

Deteksi : KLT densitometri pada λ 273 nm

- c. Penetapan Kadar Parasetamol dan Vitamin C dalam Tablet Kombinasi secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri (9)

Fase Diam : Lempeng silika gel GF 254

Fase Gerak : etanol-asam asetat glasial = (8,5:1,5)

Deteksi : KLT densitometri pada λ 254 nm

- d. Optimasi Produksi Asam Askorbat 2-Fosfat dari Asam Askorbat Menggunakan Sel *Brevundimonas diminuta* (17)

Fase Diam : Lempeng sellulosa F

Fase Gerak : butanol-asam asetat-air = (5:2:3)

Deteksi : Semprot menggunakan ferri klorida 0,5% dalam etanol yang memberikan warna merah

e. Efek Antioksidan Sintesis Asam Glikosil Askorbat oleh *Maltogenic Amilase* untuk Mereduksi Oksidasi Lemak dan Penguapan dari Pemasakan Daging Ayam (18)

Fase Diam : Lempeng silika gel

Fase Gerak : n-butil alkohol-asam asetat-air = (3:1:1)

Deteksi :

1. N-(1-naftil)-etilendiamin 0,3% dan H₂SO₄ 5% dalam metanol dan dipanaskan pada suhu 110°C selama 10 menit.
2. Deteksi UV pada λ 254 nm

f. Menurut Stahl (1969) (19)

Fase Diam : Silika gel G atau GF 254

- Fase Gerak : 1. asam asetat-aseton-metanol-benzen = (5:5:20:70)
2. etanol-asam asetat 10% = (90:10)

Deteksi : UV pada λ 365 nm

g. Menurut Hashmi (1973) (16)

Fase Diam : Kiesel gel G

Fase Gerak : 1. asam asetat-aseton-metanol-benzen=(1,5:1,5:5:12)

2. etanol

Deteksi : Larutan o-phenyldiamin 1% dalam asam asetat atau etanol

8. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

a. Penetapan Kadar Vitamin B dan Vitamin C Dalam Sediaan Multivitamin Menggunakan HPLC Fase Terbalik (5)

Metode : Fase Terbalik

Fase Diam : C18 Bondapak

Fase Gerak : metanol-asam asetat glasial-air = (26,5:0,5:73)

Detektor : UV Vis pada λ 265 nm, 290 nm dan 340 nm.

b. Penetapan Kadar Sediaan Tablet Vitamin C secara Kromatografi Cair Kinerja tinggi dan Spektrofluorometri (7)

Metode : Fase Terbalik

Fase Diam : Bondclone 10 μ CHO

Fase Gerak : metanol-air = (3:7)

Detektor : UV Vis pada λ 240 nm

c. Sintesis dan Karakterisasi 6-O-Acyl-2-O-a-D-glucopyranosyl-L-asam askorbat dengan *Branched-acyl Chain*(20)

Metode : Fase Terbalik

Fase Diam : Sephadex LH-20 column

Fase Gerak : metanol–air–aseton= (40 : 59 : 1).

B. Askorbil Fosfat (4)

Askorbil fosfat merupakan turunan vitamin C yang lebih stabil. Dengan modifikasi terhadap gugus hidroksil oleh ester fosfat menyebabkan askorbil fosfat lebih tahan terhadap oksigen di udara. Askorbil fosfat akan diubah menjadi vitamin C melalui katalisis hidrolisis oleh enzim fosfatase. Dalam sediaan kosmetik digunakan askorbil fosfat dalam bentuk magnesium askorbil fosfat dan natrium askorbil fosfat. Kedua bentuk ini digunakan karena:

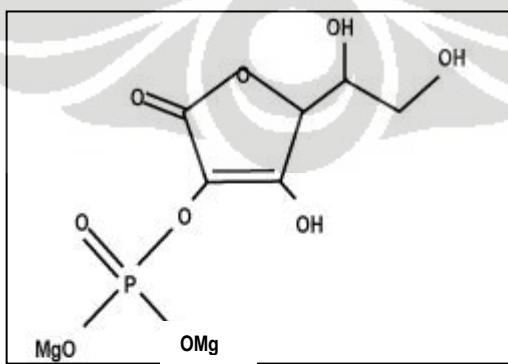
- Stabil dibawah kondisi normal
- Aman dan efektif jika digunakan secara intradermal
- Secara fisiologis lebih efektif daripada vitamin C
- Dapat mengatasi berbagai masalah kulit

1. Sintesis askorbil fosfat (21)

Suspensikan natrium L-askorbat dengan aseton sama banyak pada temperatur antara -20°C sampai 10°C , baik jika digunakan nitrogen sebagai udara. Lalu ditambahkan zat fosforilasi kira-kira 2 kali berat aseton. Gunakan temperatur -20°C sampai 0°C selama penambahan. Campuran kemudian diaduk pada temperatur 0°C sampai 5°C selama 1-2 jam dan tambahkan air sedikit demi sedikit sampai temperatur antara $15^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}$. kemudian campuran dinetralkan dengan natrium atau potassium hidroksida.

Untuk mendapatkan bentuk 3-garam logam seperti L-askorbil-3-fosfat, ditambahkan basa sampai pH diatas 9. Sedikit vitamin C yang tidak bereaksi, yang dapat dihilangkan dengan meneruskan udara secara konstan selama 1-2 jam. Garam logam diisolasi, lalu ditambahkan metanol pada temperatur $30^{\circ}\text{-}50^{\circ}\text{C}$. Hasilnya didinginkan pada temperatur $0^{\circ}\text{-}5^{\circ}\text{C}$ selama 1-3 jam. Saring, filtrat dicuci dengan metanol dan hasilnya dikeringkan pada temperatur tidak lebih dari 50°C .

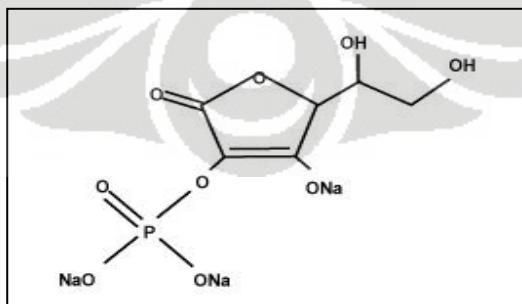
2. Magnesium askorbil fosfat (23)



Gambar 5. Rumus bangun magnesium askorbil fosfat(22)

Sinonim	:L-Ascorbic acid, 2-(dihidrogen fosfat) magnesium
Rumus Molekul	: C ₆ H ₇ O ₉ P.Mg
Berat Molekul	: 278,39
Pemerian	: serbuk berwarna putih sampai putih kekuningan
Kelarutan	: larut dalam hidrokarbon, alkohol, lemak dan minyak
Deskripsi	: magnesium askorbil fosfat merupakan turunan vitamin C yang stabil yang diubah menjadi vitamin bebas saat kontak dengan kulit. Sebagai antioksidan dan melindungi sel kulit dari sinar matahari dan asap rokok. Juga membantu meningkatkan kolagen, mencegah penuaan dan mengencangkan kulit. Di Jepang, magnesium askorbil fosfat digunakan sebagai pemutih kulit.
Konsentrasi yang diperbolehkan	: sebagai antioksidan dalam sediaan kosmetik 0,001%-3%.

3. Natrium askorbil fosfat (24)



Gambar 6. Rumus bangun natrium askorbil fosfat(24)

Sinonim : L-ascorbic acid-2-monophosphate sodium

Rumus Molekul : C₆H₆O₉Na₃P

Berat Molekul : 322,05

Pemerian : serbuk putih sedikit pucat dan praktis tidak berbau

Kelarutan : larut dalam 64% air, 13,2% gliserol dan 1,6% propilen glikol.

Aplikasi

Natrium askorbid fosfat digunakan sebagai kosmetik untuk melindungi kulit. Natrium askorbid fosfat secara enzimatis melepaskan zat aktif vitamin C di dalam kulit. Natrium askorbid fosfat merupakan antioksidan efektif yang melindungi sel dalam melawan kerusakan akibat radikal bebas. Natrium askorbid fosfat mencegah penuaan dengan meningkatkan kolagen.

Natrium askorbid fosfat juga berperan dalam proses pembentukan melanin untuk mencegah hiperpigmentasi. Sehingga berfungsi sebagai pemutih kulit. Karena spektrum kerja yang luas, maka natrium askorbid fosfat sering digunakan dalam sediaan kosmetik.

Konsentrasi yang diperbolehkan :

Perlindungan kulit 0,2-2%

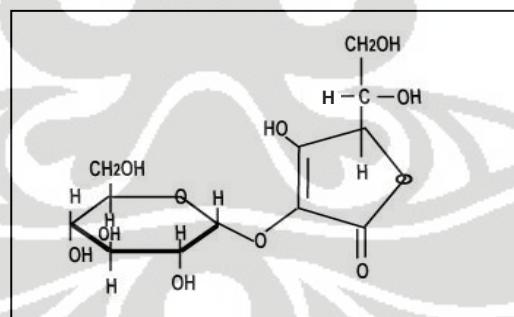
Produk pemutih >3%

C. Askorbil Glukosida

1. Sintesis askorbil glukosida (21)

Menggunakan kultur *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus usamii*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus meleus*, *Penicillium chrysogenum* atau *Penicillium purpurogenum* sebagai sumber enzim yang ditambahkan kedalam campuran natrium L-askorbat dan maltosa. Lalu campuran ini diinkubasi dan dideteksi dengan kromatografi kertas, yang memberikan nilai R_f 0,41 dan R_f untuk vitamin C 0,23. Ini mengindikasikan bentuk vitamin C glukosida atau turunan oligosakarida. Vitamin C dan turunannya ini diendapkan dan dipisahkan dari larutan untuk menghilangkan kelebihan sakarida.

2. Askorbil Glukosida (25)

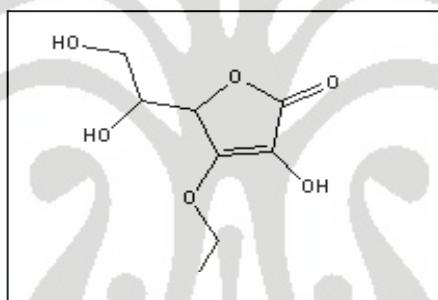


Gambar 7. Rumus bangun askorbil glukosida(26)

Sinonim	: 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid
Rumus Molekul	: C ₁₂ H ₁₈ O ₁₁

Berat Molekul	: 338,26
Pemerian	: serbuk berwarna putih atau putih kekuningan atau serbuk kristal.
Titik Leleh	: 152 - 162°C
Kelarutan	: 714 g/L at 19 ± 1°C dalam air
Konsentrasi yang digunakan	: 2% sebagai pemutih.

D. Etil Askorbil Eter (27)



Gambar 8. Rumus bangun etil askorbil eter(27)

Sinonim	: 3-O-Ethyl-L-ascorbic acid; 3-O-Ethyl ascorbil ether,(5S)-5-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-4-ethoxy-3-hydroxy-5H-furan-2-one.
Rumus molekul	: C ₈ H ₁₂ O ₆
Berat molekul	: 204,18
Pemerian	: serbuk kristal atau kristal berwarna putih dan tidak berbau.

pH : 3,0-4,5

Titik Leleh : 111⁰-116°C

Kelarutan : sangat larut dalam air ($\geq 10\%$), larut dalam etanol

Konsentrasi yang digunakan : 0,1-3,0%

E. Kromatografi Lapis Tipis

1. Pendahuluan (10,29)

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

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

atau dapat bertindak untuk melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak .

2. Penggunaan KLT (30,32)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sering digunakan untuk analisis kualitatif skala besar, dan dapat juga digunakan untuk analisis kuantitatif. Saat ini metode KLT banyak diaplikasikan untuk :

1. Memisahkan dan mengidentifikasi komponen-komponen zat dalam suatu campuran.
2. Menganalisis komponen-komponen yang terkandung dalam suatu campuran senyawa secara kuantitatif.

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

1. Penggunaannya mudah, aplikasinya luas untuk bermacam-macam sampel, sensitivitasnya tinggi, waktu pemisahannya cepat dan tidak memakan biaya mahal.
2. Polaritas pelarut atau jenis campuran pelarut dapat diubah berdasarkan percobaan.
3. Jumlah cuplikan dan pelarut yang digunakan sedikit.
4. Tidak memerlukan kemurnian sampel yang sama seperti pada KCKT.

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

Kriteria zat yang dapat dianalisis dengan KLT antara lain :

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

Sedangkan hal-hal yang harus diperhatikan untuk pelarut yang digunakan adalah :

1. Pelarut harus murni, bila perlu disaring kembali
2. Campuran pelarut hanya boleh digunakan maksimum dua atau tiga kali.
3. Komposisi campuran dapat berubah karena penyerapan atau penguapan.

4. Komponen-komponen campuran pelarut mungkin bereaksi satu sama lain.

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

3. Sistem KLT

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

a. Fase Diam (Fase stasioner)

Adsorben/penjerap yang umumnya digunakan adalah silika gel, alumina, kieselghur dan selulosa karena strukturnya yang berpori dan luas permukaannya besar. Ukuran partikel rata-rata dari adsorben tersebut adalah antara 10 dan 50 μm (30). Adsorben ini melapisi plat KLT yang dapat terbuat dari kaca, gelas, atau aluminium dengan ketebalan 250 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase

diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya (28).

Tabel 1
Beberapa Penjerap Fase Diam yang digunakan pada KLT (28)

Penjerap	Mekanisme Sorpsi
1. Silika gel	Adsorpsi
2. Silika Gel dimodifikasi dengan hidrokarbon	Partisi termodifikasi
3. Serbuk Sellulosa	Partisi
4. Alumina	Adsorpsi
5. Kieselguhr (tanah diatomae)	Partisi
6. Sellulosa penukar ion	Pertukaran ion
7. Gel Sephadex	Eksklusi
8. β -siklodekstrin	Interaksi Adsorpsi Stereospesifik

Sebelum digunakan, sebaiknya pelat kromatografi yang dilapisi adsorben dimurnikan dulu dengan cara mengelusinya menggunakan *prewashing agent* yaitu metanol. Hal ini dimaksudkan untuk membersihkan pelat dari pengotor-pengotor selain air. Selain dimurnikan dengan metanol, pelat juga harus diaktifkan dulu dengan pemanasan 120°C selama 30 menit. Tujuannya adalah untuk mengangkat air yang mungkin terdapat pada

permukaan fase diam. Temperatur yang digunakan maupun waktu pemanasan jangan terlalu tinggi karena dapat menyebabkan perubahan pada komposisi fase diam. Temperatur juga jangan terlalu rendah karena dikhawatirkan masih ada sisa-sisa dari metanol sebagai *prewashing agent* (30).

b. Fase Gerak

Fase gerak pada KLT dipilih berdasarkan sifat zat yang ingin dipisahkan dan juga tipe adsorben yang digunakan. Komposisi fase gerak bisa tunggal atau campuran yang terdiri dari tiga sampai empat campuran pelarut dengan proporsi tertentu. Sistem yang paling sederhana adalah campuran dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat terjadi secara optimal (28).

Pemilihan fase gerak sebaiknya memenuhi syarat (28) :

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

c. Penotolan Sampel

Pemisahan yang optimal pada KLT jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda.

Untuk memperoleh reproduksibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5 μ l. Jika volume yang ditotolkan lebih besar dari 2-10 μ l maka penotolan harus dilakukan bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan.

d. Deteksi Bercak

Deteksi bercak pada KLT dapat dilakukan secara kimia maupun fisika. Cara kimia digunakan dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika digunakan dengan pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet.

Cara-cara kimiawi untuk mendeteksi bercak (28):

1. Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan seluruh solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna.
2. Mengamati lempeng dibawah lampu ultraviolet pada λ emisi 254 atau 366nm.

3. Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solut organik yang akan tampak sebagai bercak hitam sampai kecoklat-coklatan.
4. Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam chamber tertutup.
5. Melakukan scanning pada permukaan lempeng dengan densitometer.

4. Metode Pengembangan KLT

Tahap selanjutnya pada KLT setelah penotolan sampel pada lempeng adalah mengembangkan sampel tersebut dalam bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan uap fase gerak (28). Ada beberapa metode untuk melakukan pengembangan dalam KLT (29,30) :

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

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

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

Metode ini membutuhkan waktu yang lebih singkat daripada metode pengembangan menaik karena efek gravitasi tidak mempengaruhi gerakan

dari fase gerak. Lempeng diletakkan secara mendatar pada bejana horizontal.

c. Metode Pengembangan Sirkuler (*Circular Development*)

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

d. Metode Pengembangan Antisirkuler (*Anticircular Development*)

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

5. Perhitungan Faktor Retardasi (Rf)

Faktor retardasi (Rf) didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak rambat zat dengan jarak rambat eluen. Rf merupakan sifat khas dari suatu cuplikan untuk identifikasi suatu zat (30). Cara menghitung Rf dengan menggunakan rumus :

$$Rf = \frac{Z_s}{Z_s - Z_o}$$

dimana : Rf = faktor retardasi

Z_s = jarak rambat zat dari posisi awal penotolan

Z_f = jarak elusi

Z_o = jarak awal elusi

6. Densitometri (30)

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

Pengukuran densitometri dapat dilakukan berdasarkan sifat absorbsifitas atau fluoresensi dari zat yang akan dianalisis (analit). Jika zat dalam bercak dapat mengabsorbsi spektrum UV atau dapat berfluoresensi, analisis dapat langsung dilakukan pada panjang gelombang yang sesuai. Zat yang tidak dapat mengabsorbsi sinar UV dapat dideteksi berdasarkan fluoresensi dari indikator fluoresens pada lempeng. Bila analit semakin dekat dengan panjang gelombang maksimum dari indikator fluoresens (254nm), maka sensitifitas pengukuran semakin tinggi. Sedangkan bila analit dapat berfluoresensi, mula-mula analit akan tereksitasi oleh sinar UV gelombang panjang, kemudian sinar emisi yang dipancarkan ketika zat kembali ke keadaan *steady state* dideteksi .

Metode pengukuran berdasarkan proses pemantulan dari fotometri resapan (*reflection-absorption photometry*), pemantulan dari fluorometri (*reflection-fluorometry*), dan transmisi dari fotometri resapan (*transmission-absorption photometry*). Batas panjang gelombang yang lazim digunakan antara 200-700 nm .

Pada umumnya semua alat densitometer dilengkapi dengan sumber cahaya, sistem fokus, detektor peka cahaya, monokromator, dan filter optik yang selektif pada panjang gelombang tertentu. Sumber cahaya yang berbeda akan menyebabkan karakteristik spektrum yang berbeda pula. Lampu deuterium (D2) dan lampu tungsten (W) adalah lampu yang sering digunakan sebagai sumber cahaya pada daerah UV. Untuk pengukuran zat yang berfluoresensi biasanya digunakan lampu merkuri (Hg) atau xenon (Xe). Lampu D2 digunakan untuk analisis pada rentang panjang gelombang 190-450 nm, lampu W pada rentang 370-800 nm dan lampu Hg pada rentang 220-650 nm. Lampu D2 dan W dapat digunakan bersamaan untuk analisis pada rentang panjang gelombang 190-800 nm.

F. Validasi Metode Analisis (31)

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

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

1. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi / absolut (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku / adisi (*standard addition method*).

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

Kadar analit dalam metode penambahan baku dapat dihitung sebagai berikut:

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

C = Kadar analit dalam sampel

S = Kadar analit yang ditambahkan pada sampel

R1 = Respon yang diberikan sampel

R2 = Respon yang diberikan campuran sampel dengan tambahan analit.

Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut :

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

Cf = Konsentrasi total sampel yang diperolah dari pengukuran

Ca = Konsentrasi sampel sebenarnya

C*b = Konsentrasi analit yang ditambahkan.

2. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai

simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi).

Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Sedangkan ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda.

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Percobaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen.

3. Selektifitas (spesifisitas)

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

Untuk tujuan uji kemurnian dan pengukuran kadar, selektivitas atau spesifisitas ditunjukkan oleh daya pisah dua senyawa yang berdekatan. Penentuannya dapat diperoleh dengan dua cara, yaitu melakukan optimasi sehingga senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain (resolusi senyawa > 2) dan menggunakan detektor selektif terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama.

4. Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasi antara 50-150% kadar analit dalam sampel. Di dalam pustaka, sering ditemukan rentang konsentrasi yang digunakan antara 0-200%. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah

garis. Nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan.

5. Batas deteksi dan batas kuantitasi

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

a. Batas deteksi (LOD)

$$LOD = \frac{k \times Sb}{SI} \quad k = 3$$

b. Batas kuantitasi (LOQ)

$$LOQ = \frac{k \times Sb}{SI} \quad k = 10$$

Keterangan :

Sb = simpangan baku respon analitik dari blanko

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

6. Ketangguhan metode (*ruggedness*)

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

7. Kekuatan (*robustness*)

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

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

1. Lokasi

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Analisis Instrumen, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia dalam kurun waktu September-November 2009.

2. Bahan

Bahan kimia : asam askorbat (Takeda), magnesium askorbil fosfat (Spec-Chem Industry), natrium askorbil fosfat (DSM), askorbil glukosida (Hayasibara Chemical), etil askorbil eter (Nardev Chemie), butanol p.a (Merck), asam asetat p.a (Merck), metanol p.a (Merck), aquadest, lempeng KLT Silika gel 60 F 254 ukuran 20 x 20 cm (Merck).

Bahan uji : tiga sediaan dalam bentuk larutan,sampel A dan B yang dibeli di apotek sedangkan sampel C dibeli di swalayan di kota Depok.

3. Alat

Bejana kromatografi lapis tipis (Camag), mikrokapiler 5 μL (Camag), KLT densitometri 3 (Camag), komputer, printer, UV kabinet (Camag),

spektrofotometer uv-vis (Shimadzu 1610), neraca analitik (Acculab ALC-210.4), pipet volume, dan alat-alat gelas.

4. Optimasi dan Validasi Metode Analisis Vitamin C dan Turunannya secara KLT densitometri

a.Pemilihan Panjang Gelombang Optimum menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Larutan baku asam askorbat, larutan baku magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter dalam metanol dibuat dengan konsentrasi 10 ppm. Lalu dibuat kurva serapannya dengan mengukur serapan larutan standar pada panjang gelombang 200 – 400 nm. Dari kurva serapan akan didapat panjang gelombang maksimum dari asam askorbat, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat askorbil glukosida dan etil askorbil eter.

b. Pemilihan Fase Gerak

Larutan standar asam askorbat, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter dengan konsentrasi masing-masing 500 ppm. Larutan tersebut ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan menggunakan pemanasan 100°C selama 30 menit dengan volume penotolan 5 μ L dan jarak penotolan 1 cm. Lempeng KLT kemudian dielusi dengan fase gerak :

1. butanol-asam asetat-air = (3:1:1)

2. metanol-air=(85:17)

3. etanol-asam asetat glasial = (8,5:1,5)

Setelah elusi selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis menggunakan KLT densitometri.

c. Pemilihan Panjang Gelombang Optimum Menggunakan KLT Densitometri

Larutan standar asam askorbat, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter dengan konsentrasi masing-masing 500 ppm. Larutan tersebut ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan menggunakan pemanasan 100°C selama 30 menit dengan volume penotolan 5 µL dan jarak penotolan 1 cm. Lempeng KLT kemudian dielusi dengan fase gerak terpilih.

Setelah elusi selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis menggunakan KLT densitometri pada panjang gelombang 200 - 400 nm. Lalu dibuat spektrum serapan dari masing-masing bercak.

d. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Larutan standar magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat dan etil askorbil eter dibuat dengan konsentrasi 300; 400; 500; 600; 700 dan 800 ppm. Sedangkan larutan standar asam askorbat dan askorbil glukosida dibuat dengan konsentrasi 400; 500; 600; 700; 800 dan 900 ppm . Masing-

masing konsentrasi ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan menggunakan pemanasan 100°C selama 30 menit dengan volume penotolan 5 µL dan jarak penotolan 1 cm. Lempeng KLT kemudian dielusi dengan fase gerak terpilih.

Setelah elusi selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis menggunakan KLT densitometri pada panjang gelombang optimal. Setelah itu dibuat kurva kalibrasi larutan standar asam askorbat, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter. Lakukan analisis hubungan antara konsentrasi dan luas puncak (area) sehingga didapat persamaan garis linear $y=a+bx$. Hitung koefisien korelasi (r) dari persamaan garis linier.

e. Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

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

$$LOD = \frac{3 \frac{Sy}{x}}{b}$$

$$LOQ = \frac{10 \frac{Sy}{x}}{b}$$

f. Uji Keterulangan

Larutan standar asam askorbat, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat dan etil askorbil eter dibuat dengan konsentrasi 300; 500 dan 700 ppm. Sedangkan asam askorbat dan askorbil glukosida dibuat dengan

konsentrasi 400; 600 dan 900 ppm. Masing-masing konsentrasi ditotolkan 6 kali pada lempeng KLT yang telah diaktifkan menggunakan pemanasan 100°C selama 30 menit dengan volume penotolan 5 μL dan jarak penotolan 1 cm. Lempeng KLT kemudian dielusi dengan fase gerak terpilih.

Setelah elusi selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis menggunakan KLT densitometri pada panjang gelombang optimal. Parameter keterulangan ditentukan dengan menghitung simpangan baku dan koefisien variasinya. Metode dianggap memiliki keterulangan yang baik jika koefisien variasinya kurang dari atau sama dengan 2%.

g. Uji Perolehan Kembali (UPK)

Uji perolehan kembali yang dilakukan menggunakan metode simulasi dimana dibuat tiga simulasi (80%, 100%, 120%). Konsentrasi simulasi 100% ditimbang, lalu ditambahkan dengan matriks. Kemudian dibuat kurva kalibrasi terhadap matriks yang digunakan.

Baku natrium askorbil fosfat ditimbang sebanyak 560 mg, 700 mg dan 840 mg. Masing-masing dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml dan dilarutkan dengan matriks, lalu dicukupkan volumenya. Masing-masing larutan baku dipipet sebanyak 1,0 ml dimasukkan dengan labu ukur 25,0 ml lalu tambahkan metanol sampai batas. Pipet 2,0 ml larutan, lalu masukkan kedalam labu ukur 10,0 ml dan cukupkan volumenya sampai 10,0 ml. Setiap

larutan ditotolkan 3 kali pada lempeng sebanyak 5 μ l lalu dielusi dan dianalisa dengan KLT densitometri.

Baku asam askorbat ditimbang sebanyak 640 mg, 800 mg dan 960 mg. Masing-masing dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml dan dilarutkan dengan matriks, lalu dicukupkan volumenya. Masing-masing larutan baku dipipet sebanyak 1,0 ml dimasukkan dengan labu ukur 10,0 ml. Lalu dicukupkan volumenya sampai batas dengan metanol. Pipet 2,0 ml larutan, lalu masukkan kedalam labu ukur 25,0 ml dan cukupkan volumenya sampai 25,0 ml. Setiap larutan ditotolkan 3 kali pada lempeng sebanyak 5 μ l lalu dielusi dan dianalisa dengan KLT densitometri.

5. Penetapan Kadar Sampel

Sampel A dipipet sebanyak 1,0 ml lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol. Pipet 1,0 ml larutan sampel, lalu cukupkan volumenya sampai 10,0 ml. Sampel B dipipet sebanyak 1,0 ml lalu dimasukkan kedalam labu ukur 25,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol. Pipet 2,0 ml larutan sampel, lalu dicukupkan volumenya sampai 10,0 ml. Sampel C dipipet sebanyak 1,0 ml lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 ml.

Larutan baku asam askorbat, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil eter askorbat dibuat dengan konsentrasi 500 ppm. Masing-masing larutan ditotolkan sebanyak 5 μ l dan

dielusi dengan fase gerak terpilih. Setelah elusi, lempeng dianalisis dengan KLT densitometri dan kadar asam askorbat, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter dalam sampel dihitung dengan persamaan kalibrasi masing-masing.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pemilihan Panjang Gelombang Optimum menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Panjang gelombang optimum menggunakan spektrofotometri uv-vis dilakukan terhadap vitamin C, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter pada panjang gelombang 200 - 400 nm. Dari hasil pengukuran diperoleh panjang gelombang maksimum untuk vitamin C adalah 256 nm, magnesium askorbil fosfat adalah 257 nm, natrium askorbil fosfat adalah 259 nm, askorbil glukosida adalah 260 nm, sedangkan untuk etil askorbil eter adalah 245 nm. Spektrum serapan dari vitamin C, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter dapat dilihat pada Gambar 11.

2. Pemilihan Fase Gerak yang Sesuai

Fase gerak yang dipilih untuk analisis sampel adalah butanol-asam asetat-air = (5:1:1) dengan waktu penjenuhan bejana \pm 3,5 jam, jarak rambat elusi 8 cm dengan Rf vitamin C sebesar 0,48, Rf

magnesium askorbil fosfat sebesar 0,02 , Rf natrium askorbil fosfat sebesar 0,03, askorbil glukosida sebesar 0,19, dan etil askorbil eter sebesar 0,76. Nilai Rf dapat dilihat pada Gambar 13.

3. Pemilihan Panjang Gelombang Optimum menggunakan KLT densitometri

Panjang gelombang optimum untuk analisis sampel menggunakan KLT densitometri dilakukan terhadap vitamin C, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh untuk vitamin C magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat dan askorbil glukosida adalah 266 nm, sedangkan untuk etil askorbil eter adalah 254 nm. Spektrum serapan dari vitamin C maupun asam dehidroaskorbat dapat dilihat pada Gambar 12.

4. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi vitamin C :

Persamaan garis : $y = -5758 + 3480x$

Koefisien korelasi : $r = 0,9990$

Kurva kalibrasi magnesium askorbil fosfat :

Persamaan garis : $y = 81,15 + 1137x$

Koefisien korelasi : $r = 0,9935$

Kurva kalibrasi natrium askorbil fosfat :

Persamaan garis : $y = -736,60 + 1166,89x$

Koefisien korelasi : $r = 0,9945$

Kurva kalibrasi askorbil glukosida :

Persamaan garis : $y = 2265 + 1763x$

Koefisien korelasi : $r = 0,9972$

Kurva kalibrasi etil askorbil eter :

Persamaan garis : $y = -3688,89 + 3544,71x$

Koefisien korelasi : $r = 0,9928$

Kurva kalibrasi dapat dilihat pada Gambar 14,15,16,17 dan 18.

5. Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi (LOD dan LOQ)

Batas deteksi untuk vitamin C adalah 0,1439 μg , dan batas kuantitasinya adalah 0,4796 μg . Batas deteksi untuk magnesium askorbil fosfat adalah 0,3900 μg , dan batas kuantitasinya adalah 1,230 μg . Batas deteksi untuk natrium askorbil fosfat adalah 0,3403

μg , dan batas kuantitasnya adalah 1,1346 μg . Batas deteksi untuk askorbid glukosida adalah 0,3538 μg , dan batas kuantitasnya adalah 1,1795 μg . Batas deteksi etil askorbid eter adalah 0,3723 μg , dan batas kuantitasnya adalah 1,2411 μg .

6. Uji Keterulangan

Uji keterulangan yang dilakukan terhadap vitamin C, natrium askorbid fosfat, askorbid glukosida dan etil askorbid eter dengan metode ini memberikan nilai koefisien variasi $\leq 2\%$. Sedangkan untuk magnesium askorbid fosfat memberikan nilai koefisien variasi diatas 2%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4, 7, 10, 13 dan 16.

7. Uji Perolehan Kembali (UPK)

Uji akurasi dilakukan melalui uji perolehan kembali (UPK) terhadap vitamin C dan natrium askorbid fosfat. Uji perolehan kembali dilakukan pada tiga konsentrasi yang berbeda dan masing-masing konsentrasi dilakukan triplo. Pada penelitian ini, uji perolehan kembali dilakukan menggunakan metode simulasi. Sebelumnya dibuat terlebih dahulu kurva kalibrasi vitamin C dan natrium askorbid fosfat terhadap matriks. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel

18 dan 19. Nilai UPK rata-rata vitamin C dari tiga konsentrasi adalah $99,98 \pm 1,909\%$ dengan nilai koefisien variasi sebesar 1,90%. Sedangkan nilai UPK rata-rata natrium askorbil fosfat dari tiga konsentrasi adalah $84,94 \pm 1,532\%$ dengan koefisien variasi sebesar 1,80%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 20 dan 21.

8. Penetapan kadar dalam sampel

Dalam sampel A terdapat vitamin C dengan kadar rata-rata 8,62%. Sampel B terdapat natrium askorbil fosfat dengan kadar rata-rata 7,62%. Sedangkan sampel C tidak ditemukan vitamin C maupun turunannya. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 17.

B. PEMBAHASAN

Optimasi kondisi dimulai dengan menentukan panjang gelombang analisis menggunakan spektrofotometer uv-vis. Larutan vitamin C, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter dibuat dengan konsentrasi 10 ppm. Kemudian dilakukan pengukuran terhadap kelima zat menggunakan KLT densitometri dengan konsentrasi 500 ppm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh menggunakan spektrofotometer uv-vis berbeda dengan yang diperoleh menggunakan KLT densitometri. Hal ini dapat terjadi karena pada spektrofotometer uv-vis, pengukuran dilakukan terhadap larutan zat,

sedangkan pada KLT densitometri, pengukuran dilakukan terhadap bercak yang terdapat pada lempeng KLT (fase padat). Untuk analisis selanjutnya, panjang gelombang optimum yang digunakan adalah panjang gelombang yang diperoleh menggunakan KLT densitometri.

Setelah memperoleh panjang gelombang optimum hal selanjutnya yang dilakukan adalah mencari fase gerak yang sesuai untuk analisis. Fase gerak yang dipilih yaitu butanol-asam asetat-air (3:1:1), . metanol-air (85:17) dan etanol-asam asetat glasial (8,5:1,5). Dari ketiga fase gerak, butanol-asam asetat-air (3:1:1) memberikan pemisahan yang baik, tetapi vitamin C tidak terdeteksi. Oleh karena itu, digunakan perbandingan lain agar didapatkan pemisahan dari kelima standar. Pada fase gerak butanol-asam asetat-air (5:1:1), vitamin C dapat terdeteksi dan Rf yang dihasilkan cukup berjauhan sehingga dipilih pada penelitian ini. Namun magnesium askorbil fosfat dan natrium askorbil fosfat masih belum dapat dipisahkan. Hal ini disebabkan karena kedua zat tersebut memiliki rumus bangun yang hampir sama.

Sebelum digunakan, lempeng KLT terlebih dahulu dielusi menggunakan metanol untuk membersihkan lempeng dari pengotor-pengotor yang ada di atas lempeng. Setelah dielusi, lempeng dikeringkan di dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit untuk menguapkan metanol dan mengangkat air yang mungkin terdapat pada permukaan fase diam.

Larutan vitamin C, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter dibuat dengan konsentrasi masing-masing 500 ppm dan ditotolkan pada lempeng KLT dengan volume penotolan 5 μ L. Lempeng dielusi dalam bejana KLT yang telah dijenuhkan. Tujuan dari penjenuhan ini adalah agar naiknya eluen pada lempeng selama elusi rata. Lempeng yang telah selesai dielusi dan dikeringkan, kemudian dianalisis menggunakan KLT densitometri.

Bercak vitamin C, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter yang telah dielusi dengan fase gerak terpilih dianalisis dengan KLT densitometri pada panjang gelombang optimum. Panjang gelombang optimum untuk vitamin C, magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida yaitu 266 nm. Sedangkan untuk etil askorbil eter diperoleh panjang gelombang optimum yaitu 254 nm. Karena pada panjang gelombang 266 nm, etil askorbil eter tidak memberikan serapan maksimum sehingga area yang dihasilkan lebih kecil.

Setelah kondisi optimum untuk analisis diperoleh, selanjutnya dilakukan validasi metode analisis. Parameter validasi yang diukur adalah linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi dan uji perolehan kembali.

Tahap pertama yang dilakukan untuk validasi metode analisis adalah membuat kurva kalibrasi. Kemudian dilakukan uji linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi yang dapat ditentukan dari hasil kurva kalibrasi.

Uji presisi dilakukan dengan menguji keterulangan metode analisis. Uji keterulangan dilakukan pada konsentrasi rendah, sedang dan tinggi dengan jumlah penotolan enam kali dari masing-masing konsentrasi. Hasil dari uji keterulangan telah memenuhi persyaratan yaitu nilai koefisien variasi di bawah 2%. Kecuali magnesium askorbil fosfat memiliki koefisien variasi diatas 2%. Hal ini disebabkan karena kurang baiknya pemisahan dari magnesium askorbil fosfat sehingga bercak yang dihasilkan tidak seragam dan memberikan area yang cukup berbeda. Selain itu, faktor penjenuhan bejana, penotolan dan pemasukan lempeng kedalam bejana juga dapat mempengaruhi keseragaman bercak yang dihasilkan.

Uji akurasi dilakukan melalui uji perolehan kembali (UPK). Pada percobaan uji perolehan kembali, digunakan tiga konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi rendah, sedang dan tinggi. Uji perolehan kembali dilakukan untuk mengetahui keakuratan dan kepresisionan metode yang dilakukan. Hasil dianggap baik bila berada dalam rentang 97 – 103% . Dalam penelitian ini, uji perolehan kembali dilakukan menggunakan metode simulasi. Dibuat terlebih dahulu kurva kalibrasi

terhadap matriks yang digunakan, karena terdapat perbedaan luas puncak dengan kurva kalibrasi terhadap standar. Kemudian UPK dihitung menggunakan kurva kalibrasi terhadap matriks. Nilai UPK vitamin C, memenuhi syarat yaitu antara 97%-103%. Sedangkan nilai UPK natrium askorbil fosfat kurang dari 97%-103%.

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini ada 3 yang dijual di apotek dan swalayan. Sampel ini dipilih karena bentuknya berupa larutan. Sampel A dan sampel B adalah serum vitamin C yang didapat dari apotek dan sampel C adalah toner pencerah kulit yang didapat dari swalayan di Depok. Dari ketiga sampel, hanya sampel B yang mencantumkan kadar turunan vitamin C yang dikandungnya. Dalam sampel A terkandung vitamin C dengan kadar 8,62%. Dalam sampel B, terkandung natrium askorbil fosfat dengan kadar 7,62% sedangkan kadar yang tertulis pada etiket sebesar 10%. Dalam sampel C, tidak terkandung vitamin C, turunannya maupun dehidroaskorbat. Kemudian spektrum serapan sampel dibandingkan dengan standar vitamin C dan natrium askorbil fosfat menggunakan KLT densitometri. Terdapat persamaan spektrum serapan sampel dengan standar vitamin C dan natrium askorbil fosfat.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Kondisi analisis optimum untuk vitamin C dan turunannya pada penelitian ini menggunakan fase gerak butanol-asam asetat-air (5:1:1), fase diam lempeng KLT silika gel 60 F 254, pada panjang gelombang 266 nm.
2. Kadar rata-rata vitamin C dalam sampel A yaitu 8,62%. Sampel B mengandung natrium askorbil fosfat dengan kadar rata-rata 7,62%. Sedangkan pada sampel C tidak ditemukan vitamin C maupun turunannya.

B. SARAN

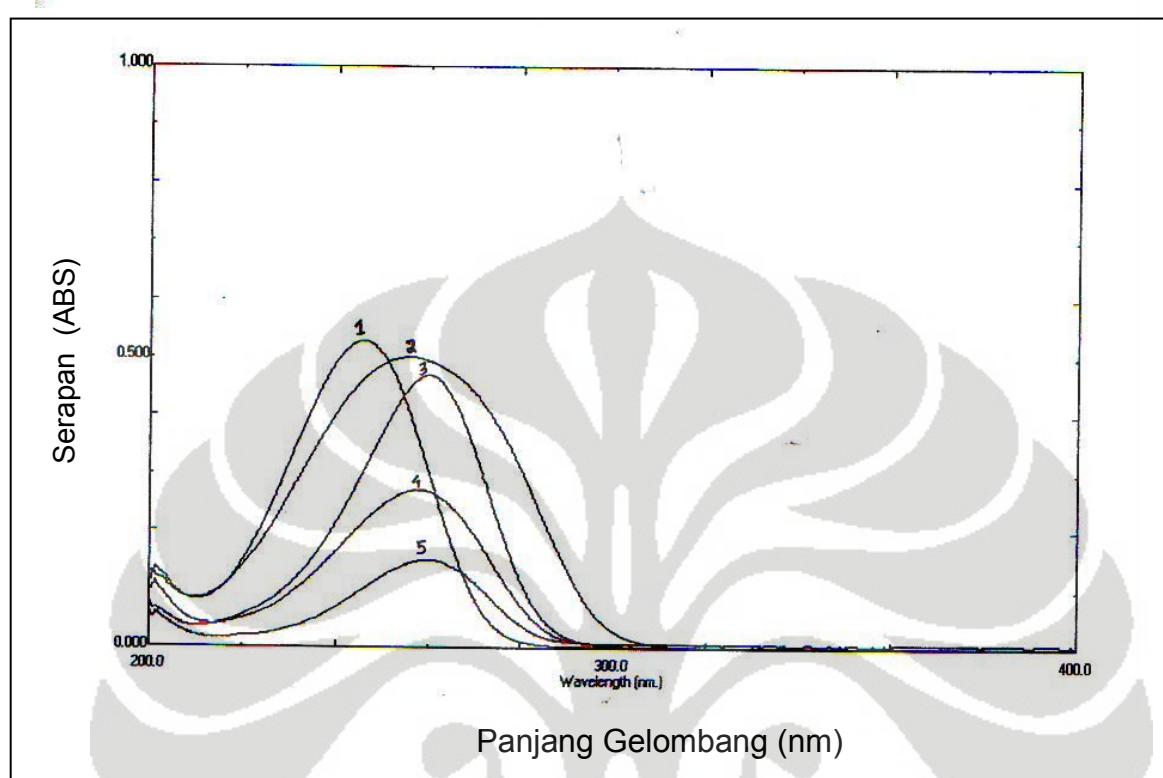
Karena dalam penelitian ini tidak dapat memisahkan magnesium askorbil fosfat dan natrium askorbil fosfat, sebaiknya dicari fase gerak lain yang dapat memisahkan kedua zat tersebut. Sehingga didapatkan hasil analisis yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tranggono, RI dan Fatma L. *Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik*. Jakarta : Gramedia, 2007: 119.
2. Ansel, HC. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi Edisi Keempat* diterjemahkan dari *Introduction to Pharmaceutical Dosage Form* oleh Farida I. UI Press. 1989: 118-120, 491-492.
3. Connors, KA, Gordon LA dan Valentino JS. *Stabilitas Kimia Sediaan Farmasi edisi satu* diterjemahkan dari *Chemical Stability of Pharmaceuticals* oleh Didik G. IKIP Semarang Press. 1992 : 181-182.
4. Anonim. *Ascorbyl Phosphate Magnesium and Ascorbyl Phosphate Sodium*. (<http://www.showadenko.us/ch/products/skincare/pdf/APM%20APS%20pages.pdf>) 24 Juli 2009 pkl 23:04.
5. Siong, TE dan Khor SC. Simultaneous determination of B-vitamins and ascorbic acid in multi-vitamin preparations by reversed-phase HPLC. *Mal J Nutr*. 2, 1996: 176-194.
6. Dian AL. Penetapan Kadar Askorbil Fosfat dan Asam Askorbat dalam Larutan Topikal Vitamin C Secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri. Depok : Skripsi Departemen Farmasi FMIPA UI, 2006: 24-27.
7. Widihasmaning, NA. Penetapan Kadar Tablet Vitamin C secara Kromatografi Cair Klnerja Tinggi (KCKT) dan Spektrofluorometri. Depok : Skripsi Departemen Farmasi FMIPA UI, 2000: 34-36.
8. Fachrisa, A. Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kadar Vitamin C dalam Minuman Suplemen. Depok : Skripsi Departemen Farmasi FMIPA UI, 2008: 27-28.
9. Aprijati, H. Penetapan Kadar Parasetamol dan Vitamin C dalam Tablet Kombinasi secara KLT Densitometri. Depok : Skripsi Universitas Pancasila, 1997.
10. Anonim. *Farmakope Indonesia IV*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995: 39, 1002.

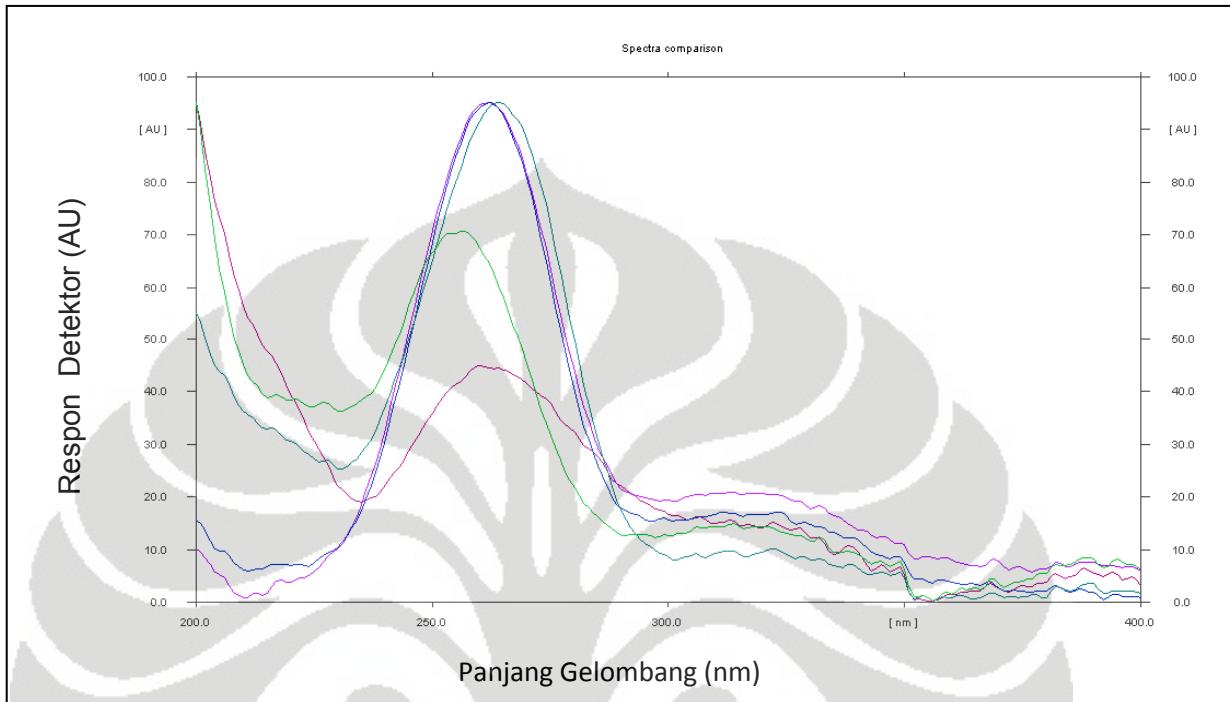
11. Anonim. *The Pharmaceutical Codex, 11th edition.* London : The Pharmaceutical Press, 1979: 61-62.
12. Anonim. *British Pharmacopoeia 5th Edition.* London : Crown Copyright, 2006: 117.
13. Walter, W. *Handbook of Organic Chemistry.* New York : Prentice Hall Europe, 1996: 448-449.
14. Bagian Farmakologi FK UI. *Farmakologi dan Terapi, Ed ke-4.* Jakarta : Percetakan Gaya Baru, 1995: 777.
15. Andarwulan, N dan Sutrisno K. *Kimia Vitamin.* Jakarta : CV. Rajawali, 1992: 32-39.
16. Hashmi, M. *Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations.* Interscience Publishers, 1973: 293-321.
17. Woo Jung, S, Byung –Yong K dan Wong-Gi B. Optimization of Ascorbic Acid 2-Phosphate Production from Ascorbic Acid Using Resting Cell Of *Brevundimonas diminuta.* *J.Microbiol.Biotechnol.* **17(5)**, 2007:769-773.
18. Lee, dkk. Antioxidative Effects of Glycosyl-ascorbic Acid Synthesized by Maltogenic Amylase to Reduce Lipid Oxidation and Volatiles Production in Cooked Chicken Meat. *Biosci.Biotechnol. Biochem.* **68(1)**, 2004:36-43.
19. Stahl, E. *Thin layer Chromathography, A Laboratory Handbook .* New York : Springer Verlag, 1969 :305-306.
20. Tai, dkk. Synthesis and Characterization of 6-O-Acyl-2-O-a-D-glucopyranosyl-Lascorbic Acids with a Branched-acyl Chain. *Chem. Pharm. Bull.* **51(2)**, 2003 : 175—180.
21. Sodano, C. *Vitamins Synthesis, Production and Use.* USA : Noyes DATA Corporation, 1978: 89, 92.
22. Anonim. *Magnesium Askorbyl Phosphate.* (<http://www.chemblink.com/products/114040-31-2.htm>) 5 Agustus 2009 21:34.

23. Anonim. *Magnesium Askorbyl Phosphate.* (<http://www.cosmetics.bASF.de/pdf/Statement>) 5 Agustus 2009 pkl 21:50.
24. Anonim. *Natrium Askorbyl Phosphate.* (<http://www.cosmetics.bASF.de/pdf/Statement>) 5 Agustus 2009 pkl 21:40.
25. Anonim. *Ascorbyl Glucoside.* (<http://www.nicnas.gov.au/publications/std1056FR.pdf>) 5 Agustus 2009 pkl 21:43.
26. Anonim. *Ascorbic Acid 2-Glucoside.* (<http://www.cosmobio.co.jp/>) 22 Agustus 2009 pkl 16:31.
27. Anonim. *3-O-ethyl ascorbic acid.* (<http://www.specchemind.com/images/eaa.pdf>) 25 Agustus 2009 pkl 18:05.
28. Ganjar, IG dan Abdul R. *Kimia Farmasi Analisis.* Yogjakarta: Pustaka Pelajar, 2007: 353-362.
29. Bernard, F dan Joseph S. *Practical Thin Layer Chromatography, A Multidisciplinary Approach.* USA : CRC Press, 1996: 1-15.
30. Touchstontou, JC, dan Murrell FD. *Practice of Thin Layer Chromatography 2nd edition.* USA : Joh Wiley & Sons, Inc, 1983: 13-14, 24, 142-146, 251-258.
31. Harmita. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia.* Depok : Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, 2006: 145-162.
32. Gruenwedel., DW dan John RW. *Food Analysis, Principles and Techniques Volume 4 Separation Techniques.* USA : Marcell Dekker, Inc, 1987: 305-306.



Gambar 9. Spektrum Serapan dengan Spektrofotometri UV-Vis

- Keterangan :
- 1. Etil askorbil eter
 - 2. Vitamin C
 - 3. Askorbil glukosida
 - 4. Magnesium askorbil fosfat
 - 5. Natrium askorbil fosfat

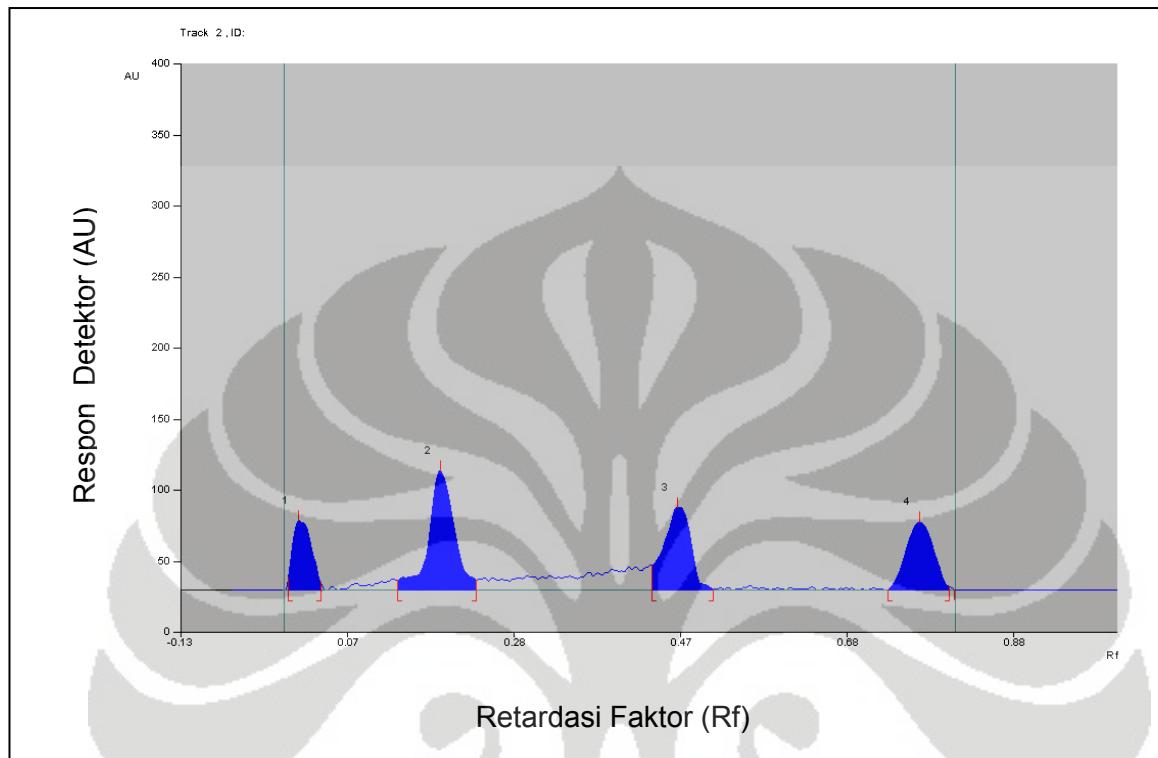


Gambar 10. Spektrum serapan menggunakan KLT densitometri

Keterangan :



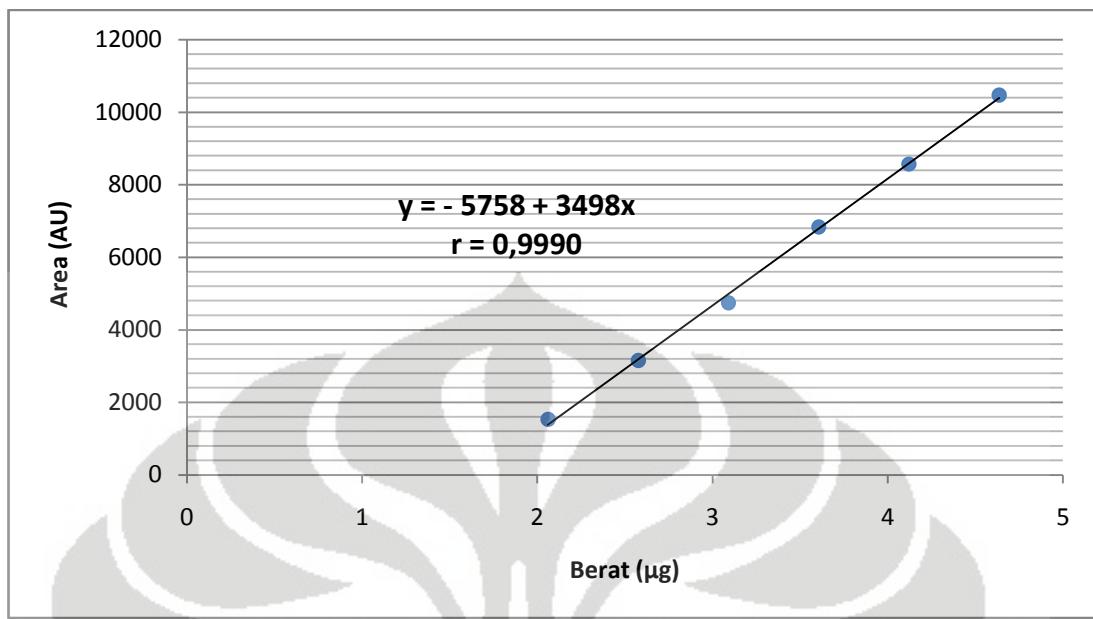
- Vitamin C
- Magnesium Askorbil Fosfat
- Natrium Askorbil Fosfat
- Askorbil Glukosida
- Etil Askorbil Eter



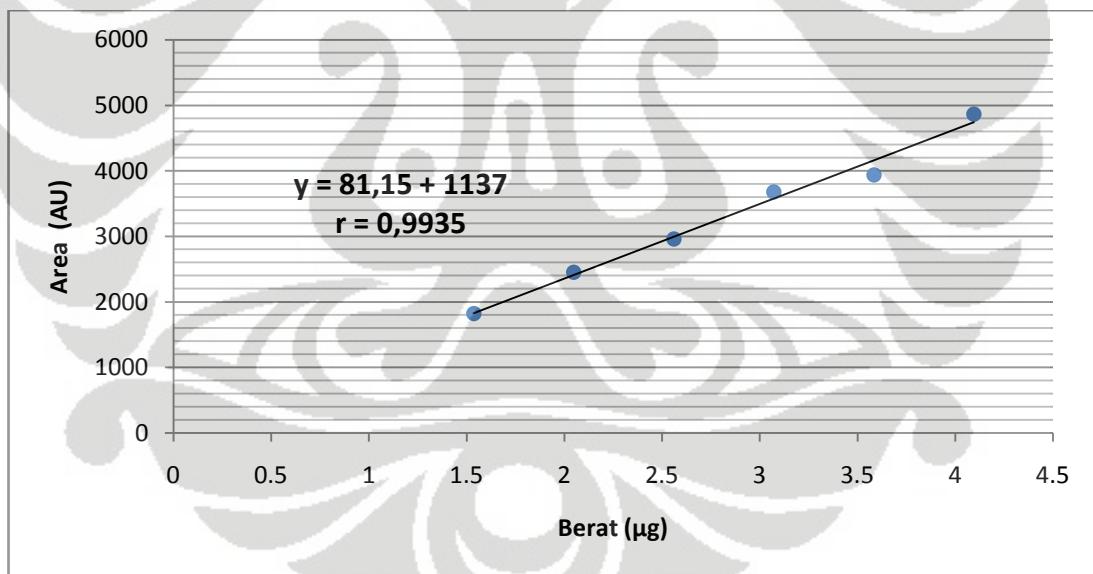
Gambar 11. Densitogram vitamin C ,magnesium askorbil fosfat, natrium askorbil fosfat, askorbil glukosida dan etil askorbil eter

Kondisi : Panjang gelombang 266 nm, fase gerak butanol-asam asetat-air (5:1:1), volume penotolan 5 μ L

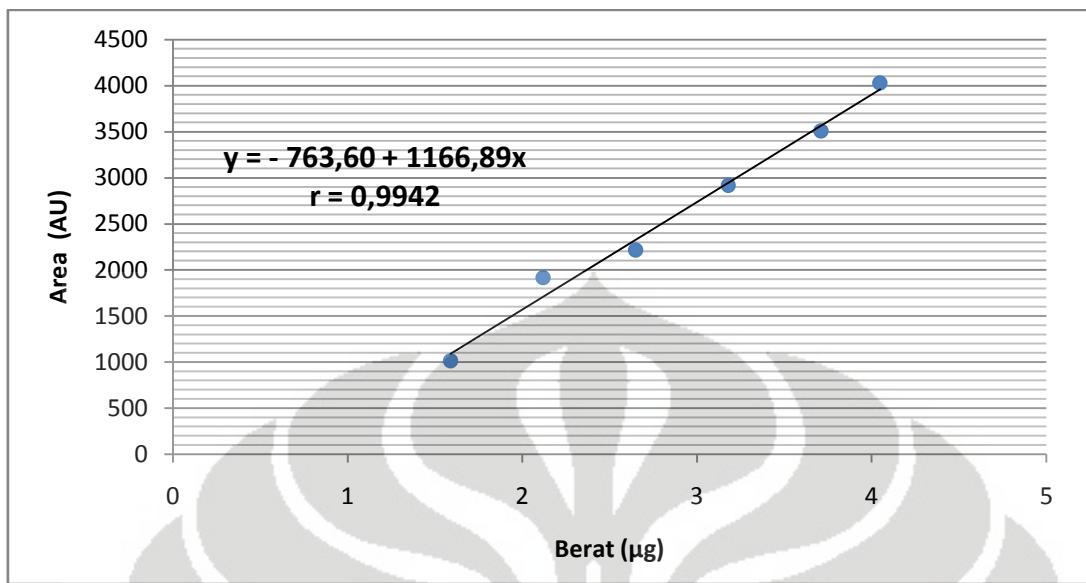
Keterangan : 1. Magnesium Askorbil Fosfat, Natrium Askorbil Fosfat
2. Askorbil Glukosida
3. Vitamin C
4. Etil Askorbil Eter



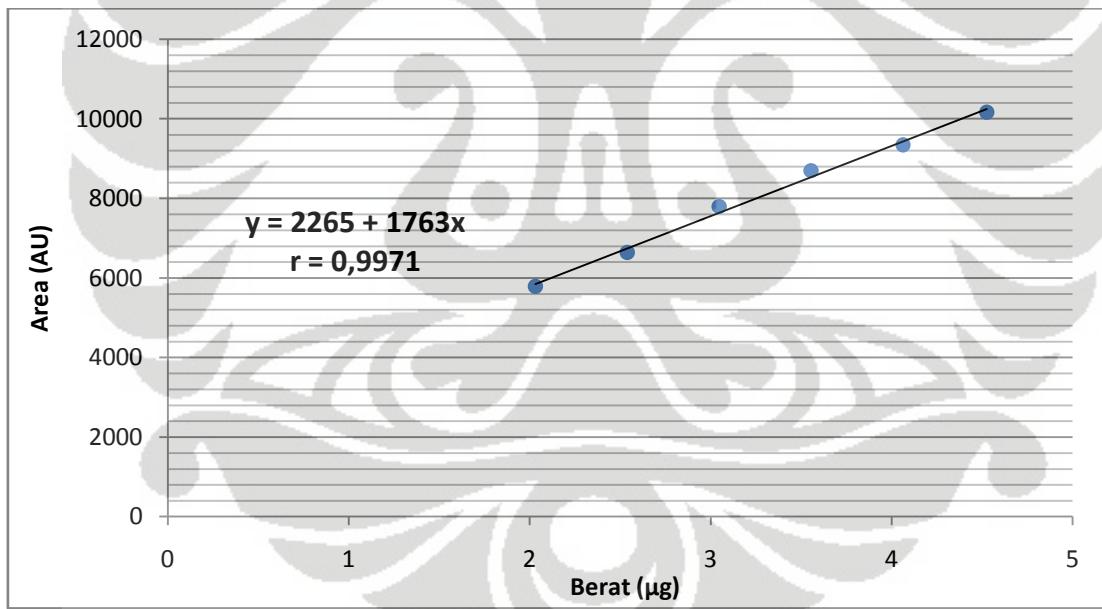
Gambar 12. Kurva kalibrasi vitamin C



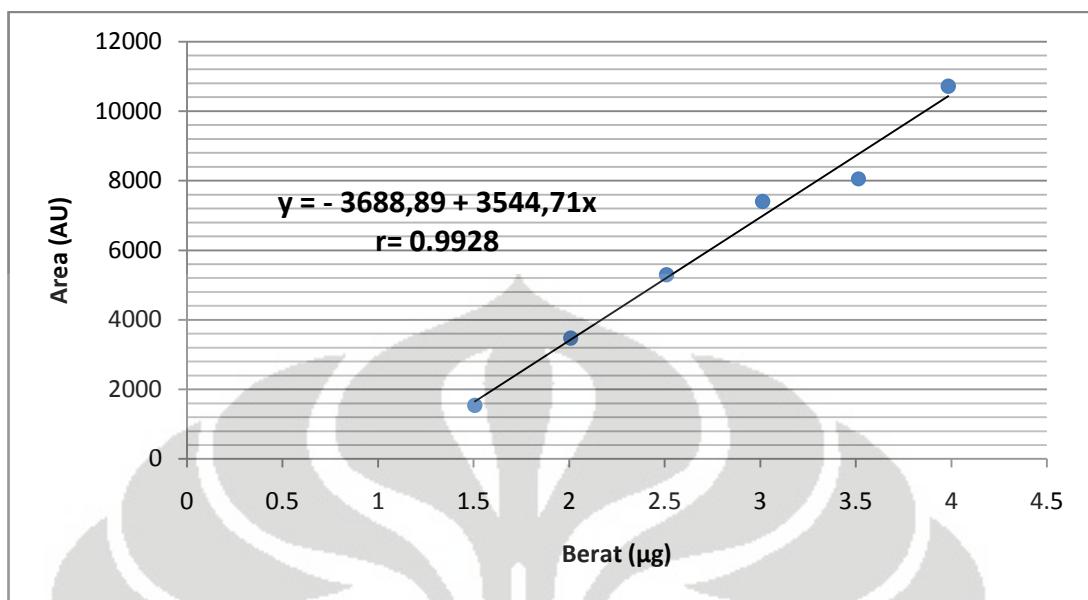
Gambar 13. Kurva kalibrasi magnesium askorbil fosfat



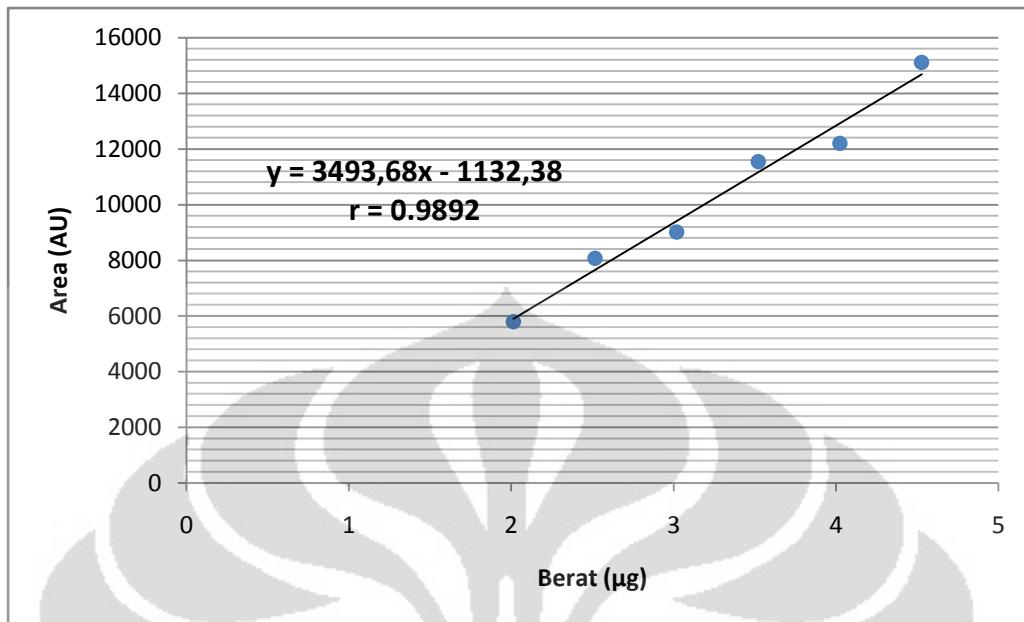
Gambar 14. Kurva kalibrasi natrium askorbil fosfat



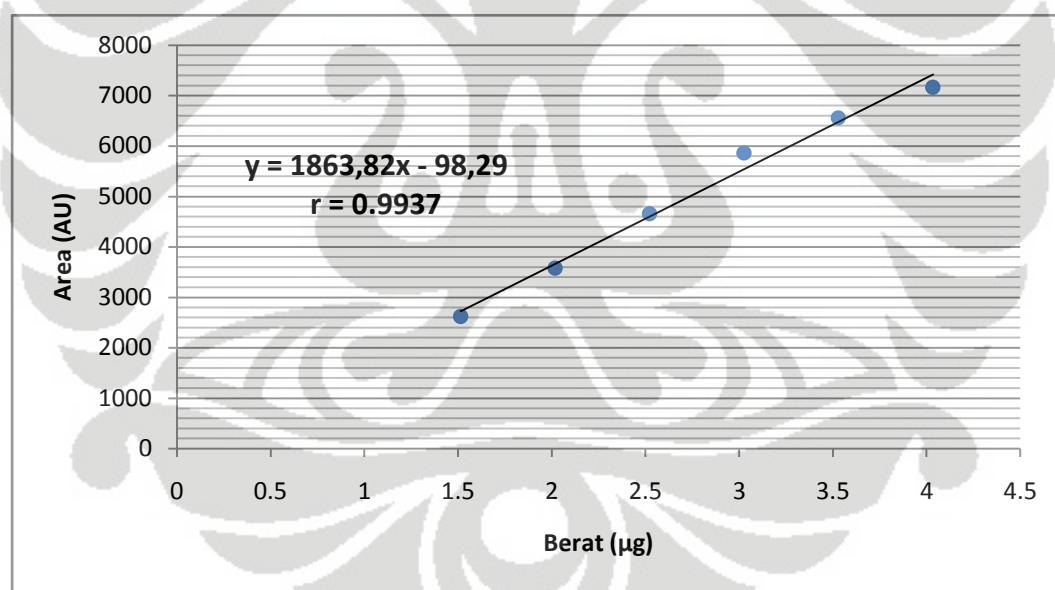
Gambar 15. Kurva kalibrasi askorbil glukosida



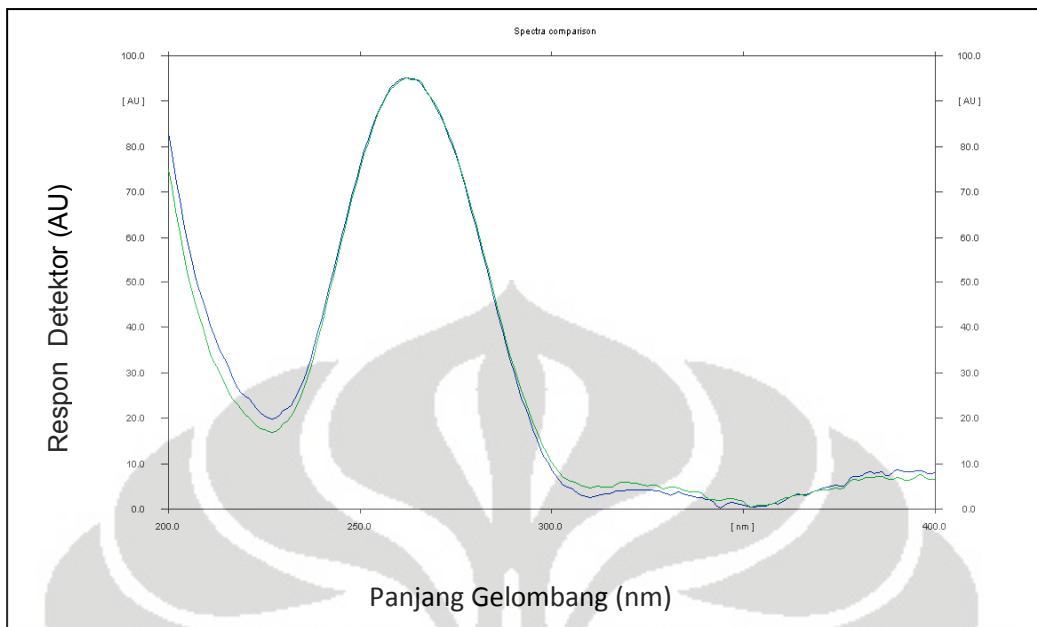
Gambar 16. Kurva kalibrasi etil askorbil eter



Gambar 17. Kurva kalibrasi vitamin C dalam matriks

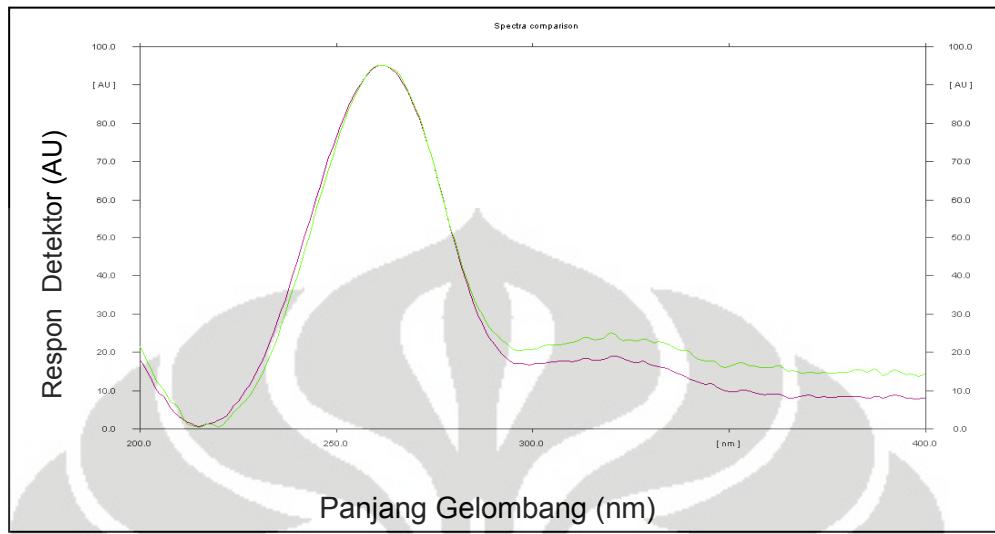


Gambar 18. Kurva kalibrasi natrium askorbil fosfat dalam matriks



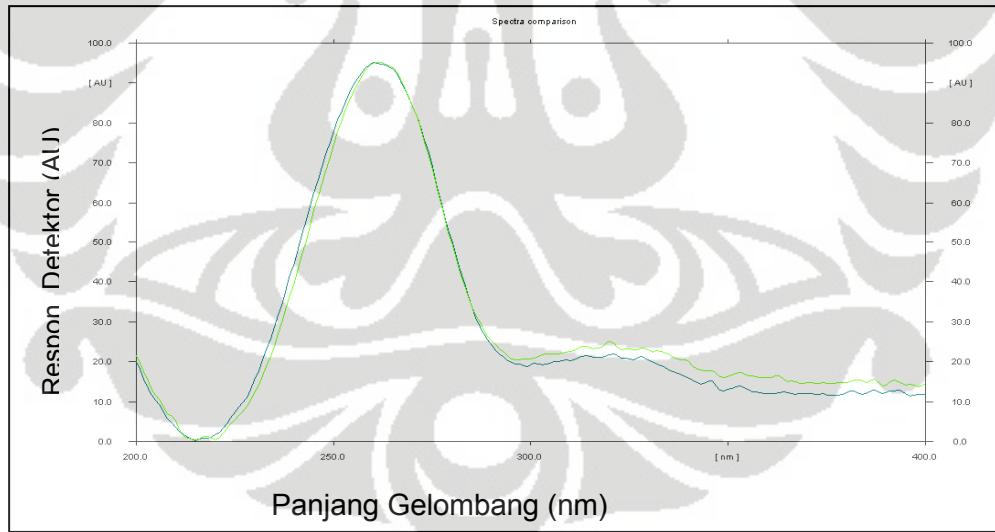
Gambar 19. Spektrum serapan sampel A dan standar vitamin C

Keterangan : ————— : spektrum serapan vitamin C
————— : spektrum serapan sampel A



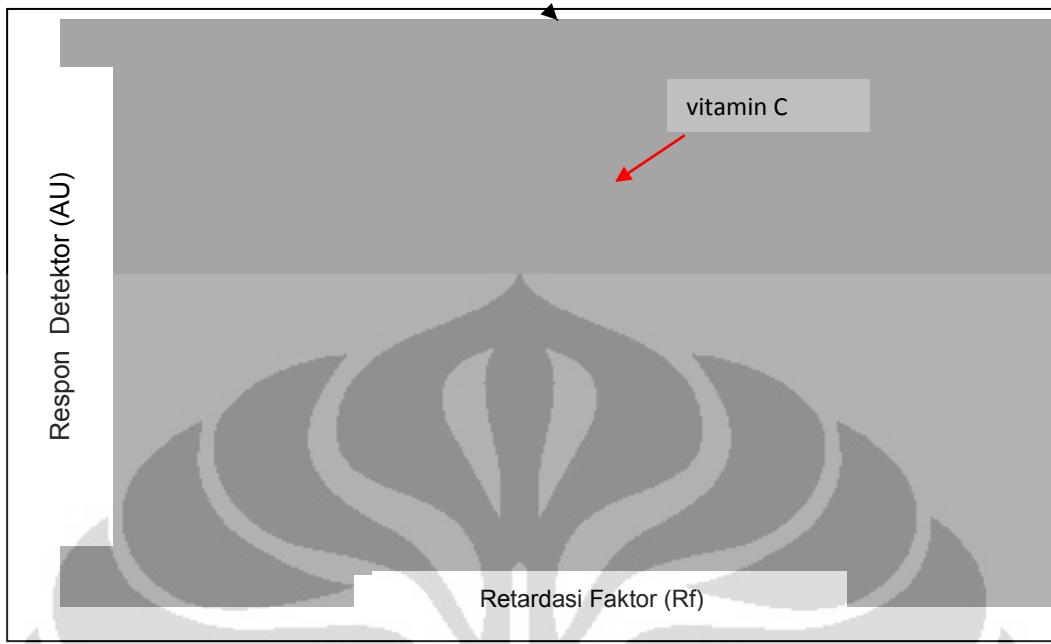
Gambar 20. Spektrum serapan sampel B dan standar natrium askorbil fosfat

Keterangan :
— : spektrum serapan natrium askorbil fosfat
— : spektrum serapan sampel B



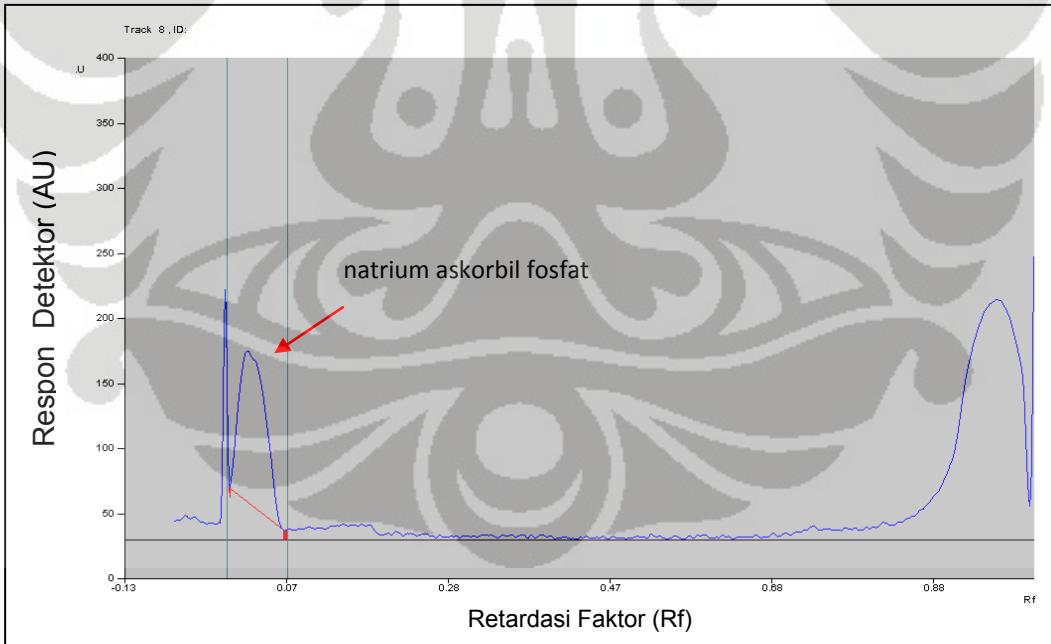
Gambar 21. Spektrum serapan sampel B dan standar magnesium askorbil fosfat

Keterangan:
— : spektrum serapan magnesium askorbil fosfat
— : spektrum serapan sampel B



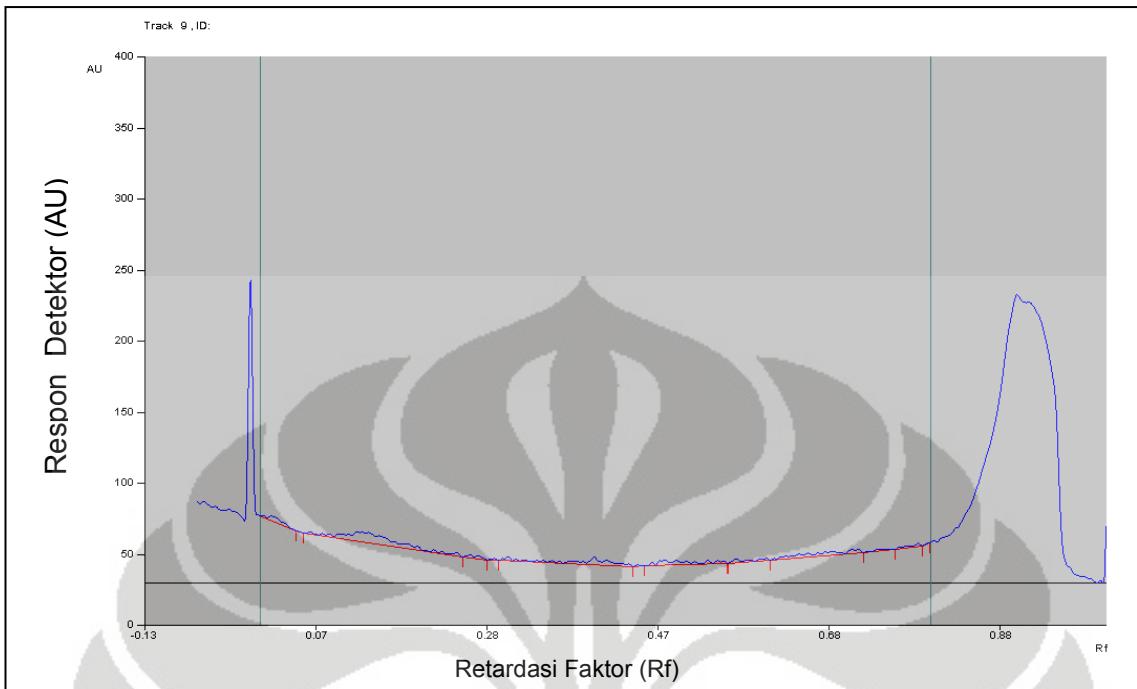
Gambar 22. Densitogram sampel A yang mengandung vitamin C

Kondisi : Panjang gelombang 266 nm, fase gerak butanol-asam asetat-air (5:1:1), volume penotolan 5 μ L.



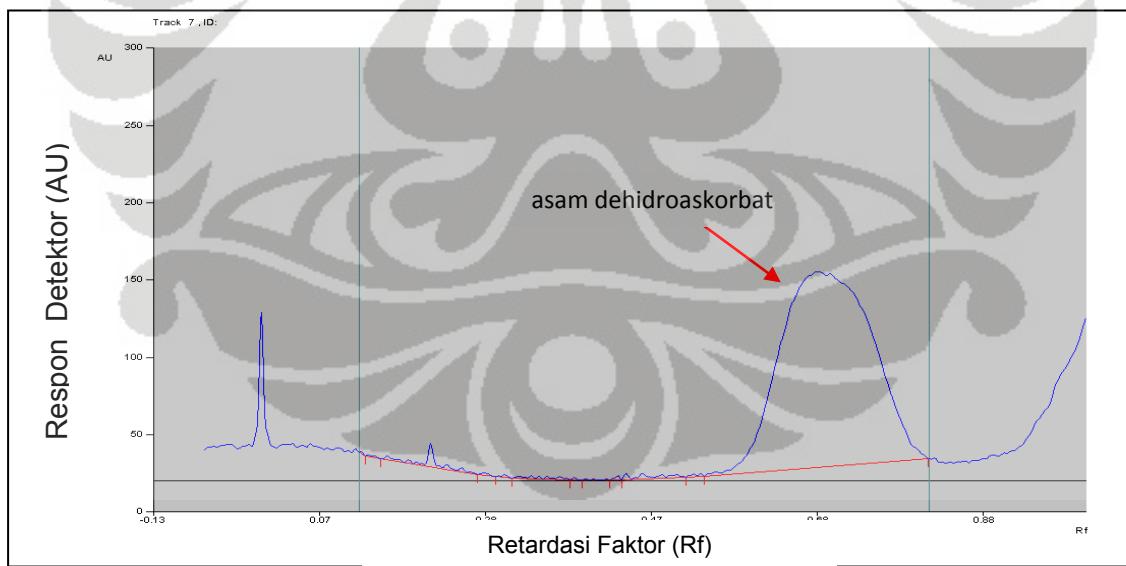
Gambar 23. Densitogram sampel B yang mengandung natrium askorbil fosfat

Kondisi : Panjang gelombang 266 nm, fase gerak butanol-asam asetat-air (5:1:1), volume penotolan 5 μ L.



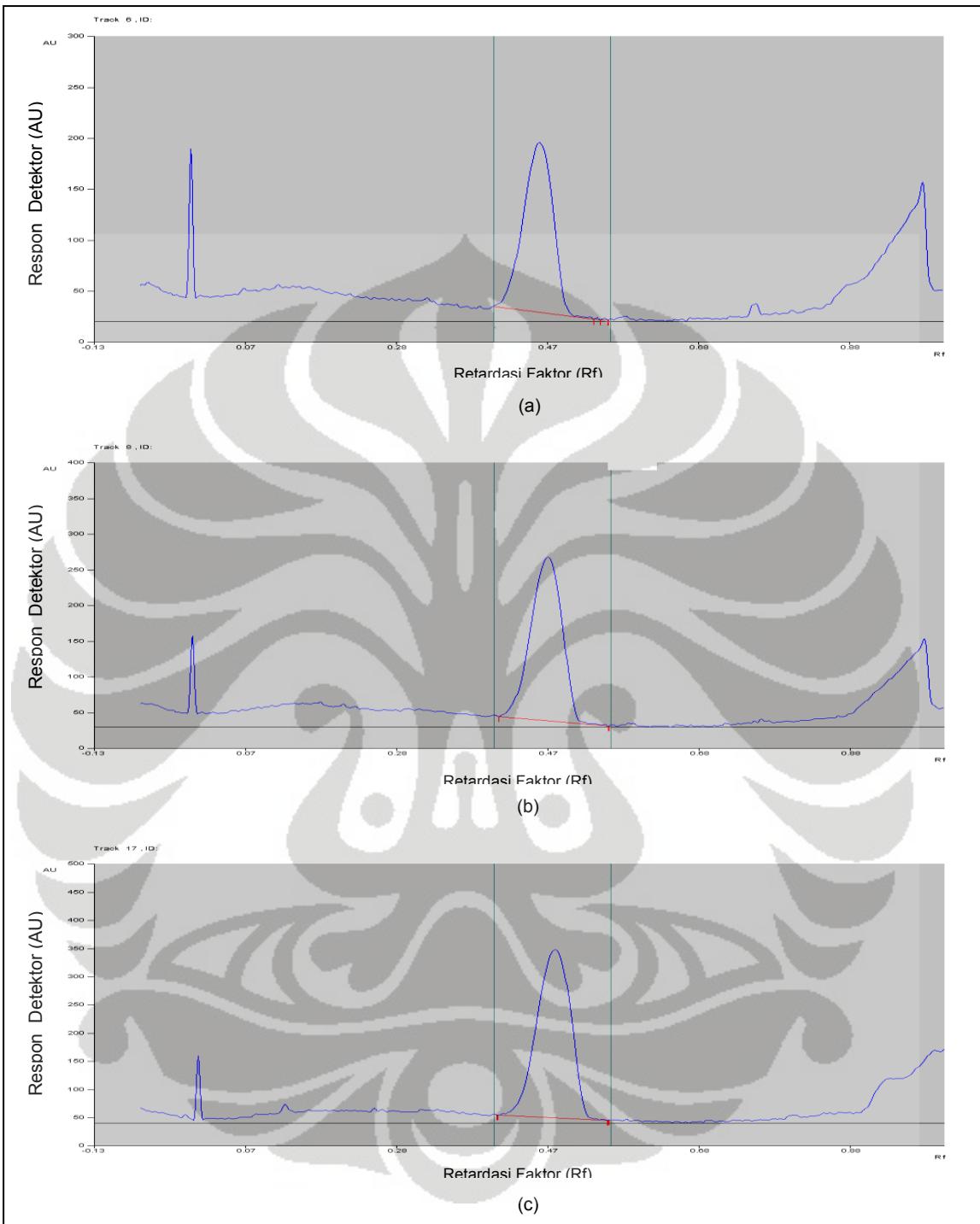
Gambar 24. Densitogram Sampel C

Kondisi : Panjang gelombang 266 nm, fase gerak butanol-asam asetat-air (5:1:1), volume penotolan 5 μ L.



Gambar 25. Densitogram Asam Dehidroaskorbat

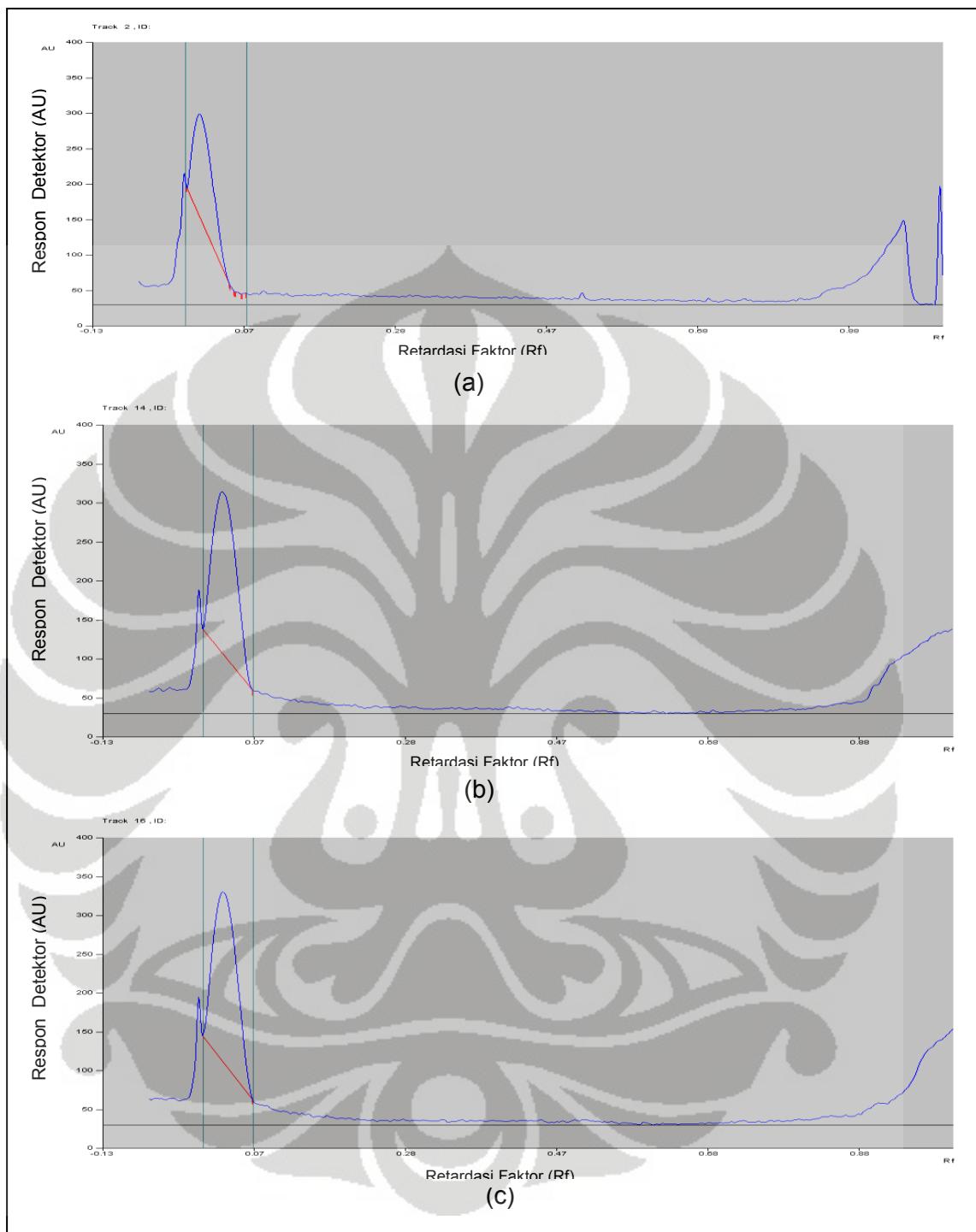
Kondisi : Panjang gelombang 266 nm, fase gerak butanol-asam asetat-air (5:1:1), volume penotolan 5 μ L



Gambar 26. Densitogram uji perolehan kembali vitamin C

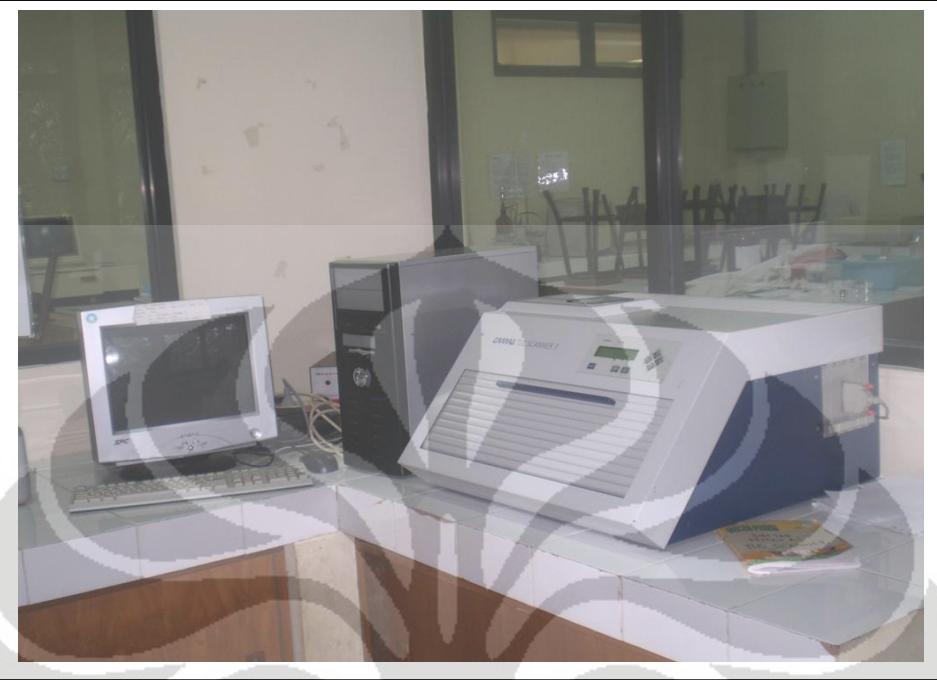
Keterangan : a. Konsentrasi rendah, b. Konsentrasi sedang,
c. Konsentrasi tinggi

Kondisi : Panjang gelombang 266 nm, fase gerak butanol-asam asetat-air
(5:1:1), volume penotolan 5 μ L.



Gambar 27. Densitogram uji perolehan kembali natrium askorbil fosfat
Keterangan : a. Konsentrasi rendah, b. Konsentrasi sedang,
c. Konsentrasi tinggi

Kondisi : Panjang gelombang 266 nm, fase gerak butanol-asam asetat-air (5:1:1), volume penotolan 5 μ L



Gambar 28. Alat TLC scanner 3 (Camag) beserta komputer yang dilengkapi program winCATS



Gambar 29. Sampel A, B dan C

Keterangan :

1. Sampel A mengandung vitamin C dengan kadar rata-rata 8,62%.
2. Sampel B mengandung natrium askorbil fosfat dengan kadar rata-rata 7,62%.
3. Sampel C tidak mengandung vitamin C maupun turunannya.

Tabel 2
Kurva Kalibrasi dan Linearitas Asam Askorbat

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μ L (μ g) [x]	Luas Puncak [y]
412	2,060	1592,01
515	2,575	3152,27
618	3,090	4741,02
712	3,605	6832,97
814	4,120	8567,77
927	4,635	10471,46

Persamaan garis : $y = -5758 + 3480 x$
Koefisien korelasi (r) : 0,9990

Tabel 3
Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Asam askorbat

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μL (μg) [x]	Luas Puncak [y]	y'	$(y - y')^2$
412	2,060	1592,01	1410,8	32837,06
515	2,575	3152,27	3203,0	2573,53
618	3,090	4741,02	4995,2	64607,47
712	3,605	6832,97	6787,4	1337,36
814	4,120	8567,77	8579,6	139,95
927	4,635	10471,46	10371,8	9932,16
$\Sigma = 111427,65$				

Keterangan :

y' = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

$S(y/x) = 166,90$

LOD = 0,1439 μg

LOQ = 0,4796 μg

Tabel 4
Uji Keterulangan Asam askorbat

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μL (μg)	Luas Puncak [y]	x'	\bar{x}'	SD	KV (%)
436	2,180	1321,9	2,0399	2,0399	0,018	0,88
		1345,0	2,0411			
		1338,4	2,0392			
		1400,8	2,0571			
		1406,8	2,0588			
		1234,0	2,0092			
628	3,138	3375,67	2,6246	2,6367	0,039	1,46
		3433,61	2,6413			
		3381,49	2,6262			
		3573,41	2,6814			
		3200,26	2,5742			
		3541,29	2,6722			
941	4,707	8898,74	4,2117	4,2018	0,055	1,31
		9216,17	4,3029			
		8663,58	4,1441			
		8771,20	4,1751			
		8878,83	4,2059			
		8759,29	4,1716			

Keterangan :

x' = Berat (μg) berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Tabel 5
Kurva Kalibrasi dan Linearitas Magnesium Askorbil Fosfat

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μ L (μ g) [x]	Luas Puncak [y]
307,2	1,536	1820,62
409,6	2,048	2451,36
512	2,560	2958,55
614,4	3,072	3677,38
716,8	3,584	3934,89
819,2	4,096	4863,60

Persamaan garis : $y = 81,15 + 1137 x$

Koefisien korelasi (r) : 0,9935

Tabel 6

Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Magnesium Askorbil Fosfat

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μL (μg) [x]	Luas Puncak [y]	y'	$(y - y')^2$
307,2	1,536	1820,62	1827,58	48,46944
409,6	2,048	2451,36	2409,72	1733,39
512	2,560	2958,55	2991,87	1110,222
614,4	3,072	3677,38	3574,01	10684,53
716,8	3,584	3934,89	4156,15	48959,53
819,2	4,096	4863,6	4738,30	15699,59
$\Sigma = 78235,73$				

Keterangan :

y' = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

$S(y/x) = 139,85$

LOD = 0,3900 μg

LOQ = 1,2300 μg

Tabel 7
Uji Keterulangan Magnesium Askorbil Fosfat

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μL (μg)	Luas Puncak [y]	x'	\bar{x}'	SD	KV (%)
302,4	1,512	1721,5	1,4427	1,4532	0,036	2,47
		1754,8	1,4719			
		1712,0	1,4343			
		1730,1	1,4502			
		1681,3	1,4073			
		1801,3	1,5128			
504	2,520	2434,1	2,0694	2,0253	0,100	4,94
		2458,7	2,0910			
		2418,7	2,0558			
		2506,3	2,1329			
		2221,8	1,8827			
		2264,0	1,9198			
806,4	4,032	5851,2	5,0725	5,2689	0,215	4,08
		5857,6	5,0781			
		5889,2	5,1059			
		6132,4	5,3197			
		6271,4	5,4419			
		6429,6	5,5810			

Keterangan :

x' = Berat (μg) berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Tabel 8
Kurva Kalibrasi dan Linearitas Natrium Askorbil Fosfat

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μ L (μ g) [x]	Luas Puncak [y]
318	1,590	1012,48
424	2,120	1915,40
530	2,650	2216,16
636	3,180	2919,06
742	3,710	3508,97
809	4,050	4031,20

Persamaan garis : $y = -736,60 + 1166,89 x$

Koefisien korelasi (r) : 0,9942

Tabel 9
Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Natrium Askorbil Fosfat

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μL (μg) [x]	Luas Puncak [y]	y'	$(y-y')^2$
318	1,59	1012,48	1091,75	6284,54
424	2,12	1915,40	1710,20	42104,24
530	2,65	2216,16	2328,65	12655,91
636	3,18	2919,06	2947,11	786,81
742	3,71	3508,97	3565,56	3202,64
809	4,048	4031,20	3959,97	5073,61
<hr/>				$\Sigma =$
70107,77				<hr/>

Keterangan :

y' = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

$S(y/x) = 132,39$

LOD = 0,3403 μg

LOQ = 1,1346 μg

Tabel 10
Uji Keterulangan Natrium Askorbil Fosfat

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μL (μg)	Luas Puncak [y]	x'	\bar{x}'	SD	KV (%)
301,2	1,506	3009,2	3,2100	3,2267	0,065	2,00
		3160,9	3,3400			
		3012,1	3,2125			
		2929,6	3,1418			
		3012,1	3,2125			
		3048,3	3,2435			
502	2,510	6089,3	5,8496	5,9093	0,115	1,95
		6047,4	5,8137			
		5995,6	5,7693			
		6205,2	5,9489			
		6300,0	6,0302			
		6315,6	6,0435			
803,2	4,016	8433,0	7,8581	7,7760	0,153	1,97
		8436,0	7,8607			
		8458,0	7,8795			
		8466,7	7,8870			
		8186,5	7,6469			
		8042,8	7,5237			

Keterangan :

x' = Berat (μg) berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Tabel 11
Kurva Kalibrasi dan Linearitas Askorbil Glukosida

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μ L (μ g) [x]	Luas Puncak [y]
406,4	2,032	5786,28
508	2,540	6640,92
609,6	3,048	7796,01
711,2	3,556	8697,39
812,8	4,064	9346,31
905,4	4,527	10169,07

Persamaan garis : $y = 2265 + 1763 x$
Koefisien korelasi (r) : 0,9972

Tabel 12
Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Askorbil Glukosida

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μL (μg) [x]	Luas Puncak [y]	y'	$(y - y')^2$
406,4	2,032	5786,28	5772,232	197,34
508	2,54	6640,92	6649,04	65,93
609,6	3,048	7796,01	7525,848	72987,50
711,2	3,556	8697,39	8402,656	86868,13
812,8	4,064	9346,31	9279,464	4468,38
905,4	4,527	10169,07	10078,602	8184,45
$\sum = 172771,76$				

Keterangan :

y' = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

$S(y/x) = 207,89$

LOD = 0,3539 μg

LOQ = 1,1795 μg

Tabel 13
Uji Keterulangan Askorbil Glukosida

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μ L (μ g)	Luas Puncak [y]	x'	\bar{x}'	SD	KV (%)
406,4	2,032	4758,7	1,4447			
		4778,6	1,4563			
		4771	1,4519			
		4776,7	1,4552	1,4480		
		4787,1	1,4612			
		4713,9	1,4188			
609,6	3,048	6518,7	2,4644			
		6561,0	2,4889			
		6605,0	2,5144			
		6563,0	2,4901	2,5117		
		6683,7	2,5600			
		6670,5	2,5524			
905,4	4,527	8357,6	3,5299			
		8273,5	3,4812			
		8281,2	3,4856			
		8316,3	3,5060	3,5291		
		8360,4	3,5315			
		8548,8	3,6407			

Keterangan :
 x' = Berat (μ g) berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Tabel 14
Kurva Kalibrasi dan Linearitas Etil Askoril Eter

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μ L (μ g) [x]	Luas Puncak [y]
301,2	1,506	1535,91
401,6	2,008	3473,72
502,0	2,510	5295,27
602,4	3,012	7400,58
702,8	3,514	8051,08
796,8	3,984	10718,4

Persamaan garis : $y = -3688,89 + 3544,71x$
Koefisien korelasi (r) = 0,9928

Tabel 15
Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Etil Askorbil Eter

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μL (μg) [x]	Luas Puncak [y]	y'	$(y - y')^2$
301,2	1,506	1535,91	1649,443	12889,80
401,6	2,008	3473,72	3428,888	2009,93
502,0	2,510	5295,27	5208,332	7558,19
602,4	3,012	7400,58	6987,777	170406,70
702,8	3,514	8051,08	8767,221	512857,80
796,8	3,984	10718,4	10433,23	81319,28
$\sum = 774152,98$				

Keterangan :

y' = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

$S(y/x) = 439,92$

LOD = 0,3723 μg

LOQ = 1,2411 μg

Tabel 16
Uji Keterulangan Etil Askorbil Eter

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μL (μg)	Luas Puncak [y]	x'	$\overline{x'}$	SD	KV (%)
298,8	1,494	1892,0	1,5744			
		1949,8	1,5907			
		1978,4	1,5988			
		1994,5	1,6033	1,6018	0,019	1,19
		2028,3	1,6129			
		2091,4	1,6307			
512	2,560	2221,0	1,6672			
		2274,1	1,6822			
		2148,7	1,6468			
		2142,8	1,6452	1,6550	0,016	0,99
		2118,5	1,6383			
		2162,2	1,6507			
796,8	3,984	12491,5	4,5647			
		12318,3	4,5158			
		12662,6	4,6129			
		12935,1	4,6898	4,6007	0,066	1,43
		12474,9	4,5600			
		12833,2	4,6611			

Keterangan :

x' = Berat (μg) berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Tabel 17
Penetapan Kadar Sampel

Sampel	Luas Puncak [y]					x	% kadar (b/v)	%kadar rata-rata	SD(%)	KV(%)
	AA	MAF	NAF	AAG	EEA					
A	6347,9	-	-	-	-	3,4787	8,69	8,62	0,151	1,76
	6579,7	-	-	-	-	3,5453	8,86			
	6357,7	-	-	-	-	3,4815	8,70			
	6104,3	-	-	-	-	3,4087	8,52			
	6056,0	-	-	-	-	3,3948	8,48			
	6302,8	-	-	-	-	3,4657	8,66			
	6310,7	-	-	-	-	3,4680	8,67			
	5906,6	-	-	-	-	3,3519	8,37			
B	-	-	2887,0	-	-	3,1285	7,82	7,62	0,124	1,63
	-	-	2774,8	-	-	3,0323	7,58			
	-	-	2788,9	-	-	3,0444	7,61			
	-	-	2799,8	-	-	3,0538	7,63			
	-	-	2713,7	-	-	2,9800	7,44			
	-	-	2756,3	-	-	3,0165	7,54			
	-	-	2853,8	-	-	3,1000	7,75			
	-	-	2837,0	-	-	3,0856	7,71			
	-	-	2726,1	-	-	2,9906	7,47			

Keterangan :

- AA = asam askorbat
- MAF = magnesium askorbil fosfat
- NAF = natrium askorbil fosfat
- AAG = askorbil glukosida
- EEA = etil askorbil eter

Tabel 19
 Kurva Kalibrasi, Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi
 Asam Askorbat dalam Matriks

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μL (μg) [x]	Luas Puncak [y]	y'	$(y - y')^2$
402,4	2,012	5794,39	5895,92	10307,53
503,0	2,515	8071,03	7652,89	174836,88
603,6	3,018	9017,36	9409,88	154067,24
704,2	3,521	11544,69	11166,85	142760,80
804,8	4,024	12202,49	12923,83	520334,28
905,4	4,527	15111,26	14680,81	185286,34
$\sum = 1187593,10$				

Persamaan garis : $y = -1132,38 + 3493,68x$
 Koefisien korelasi (r) = 0,9892

Keterangan :

y' = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

$S(y/x) = 544,88$

$LOD = 0,4679 \mu\text{g}$

$LOQ = 1,5599 \mu\text{g}$

Tabel 20
Kurva Kalibrasi, Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi
Natrium Askorbil Fosfat dalam Matriks

Konsentrasi (ppm)	Berat/ μL (μg) [x]	Luas Puncak [y]	y'	$(y - y')^2$
302,6	1,513	2615,5	2720,43	11010,10
403,4	2,017	3574,1	3659,38	7272,85
504,2	2,521	4655,4	4598,33	3256,64
605,0	3,025	5857,8	5537,29	102729,87
705,8	3,529	6556,0	6476,24	6362,14
806,8	4,034	7163,5	7417,05	64288,62
$\Sigma = 194920,20$				

Persamaan garis : $y = -98,29 + 1863,82x$
Koefisien korelasi (r) = 0,9937

Keterangan :

y' = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

$S(y/x) = 220,75$

LOD = 0,3554 μg

LOQ = 1,1849 μg

Tabel 21

Uji Perolehan Kembali Asam askorbat

Berat Standard (μg)	Luas Puncak [y]	x'	UPK (%)	UPK rata-rata (%)	KV (%)
2,5584	7555,1	2,4862	97,18	99,98 ± 1,909	1,90
	7890,9	2,5823	100,94		
	7965,0	2,6036	101,76		
3,1200	9697,0	3,0993	99,33		
	9530,6	3,0516	97,81		
	9552,5	3,0579	98,01		
3,8000	12308,8	3,8468	101,23		
	12428,7	3,8811	102,13		
	12331,1	3,8532	101,40		

x' = berat sampel asam askorbat berdasarkan persamaan kurva kalibrasi asam askorbat dalam matriks

Tabel 22

Uji Perolehan Kembali Natrium Askorbil Fosfat

Berat Standard (μg)	Luas Puncak [y]	x'	UPK (%)	UPK rata-rata (%)	KV (%)
2,2596	3563,8	1,9657	86,99	84,94	1,80
	3337,0	1,8439	81,61	± 1,533	
	3510,3	1,9369	85,72		
2,8372	4372,7	2,3998	84,58		
	4434,6	2,4331	85,75		
	4418,1	2,4242	85,44		
3,3816	5311,4	2,9038	85,87		
	5213,7	2,8513	84,31		
	5205,9	2,8471			
			84,19		

x' = berat sampel natrium askorbil fosfat berdasarkan persamaan kurva kalibrasi natrium askorbil fosfat dalam matriks

Lampiran 1

Perhitungan kurva kalibrasi

Dari kurva kalibrasi didapatkan persamaan :

$$y = a + bx$$

r = koefisien korelasi

a dan b dihitung dengan rumus :

$$a = n \times \sum xi \cdot yi - (\sum xi) \cdot (\sum yi)$$

$$\frac{n \times \sum xi^2 - (\sum xi)^2}{}$$

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

Koefisien korelasi (r) dihitung dengan rumus :

$$r = \frac{n \times \sum xi \cdot yi - (\sum xi) \cdot (\sum yi)}{\sqrt{[(n \times \sum xi^2 - (\sum xi)^2) \times (n \times \sum yi^2 - (\sum yi)^2)]}}$$

Lampiran 2

Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

Rumus :

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

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

$$Sy/x = \sqrt{\frac{\sum (y-y')^2}{n-2}}$$

Keterangan :

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

Sy/x = Simpangan baku residual

y = Luas puncak terukur

y' = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Lampiran 3

Perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi

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

Simpangan baku atau standar deviasi :

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

Koefisien variasi (RSD atau KV (%)) :

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

Keterangan :

x = Berat/ μ L (μ g)

\bar{x} = Berat/ μ L rata-rata (μ g)

n = Jumlah data

Lampiran 4

Perhitungan uji perolehan kembali

Uji Perolehan Kembali (UPK) dihitung dengan rumus :

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

Keterangan :

x' = Berat (μg) sampel yang didapat menggunakan persamaan kurva kalibrasi

x = Berat (μg) sampel

Lampiran 5

Perhitungan kadar sampel

Berat asam askorbat/ μ l (μ g) dalam larutan dihitung menggunakan persamaan

kurva kalibrasi : $y = -5758 + 3480 x$

Dengan : y = luas puncak

x = berat asam askorbat/ μ l (μ g)

Jumlah per fraksi asam askorbat (μ g) dalam larutan, yaitu :

$$x = \frac{y + 5758}{3480}$$

Berat asam askorbat dalam sampel (mg) :

$$\text{X } \times \frac{1000}{\text{volume penololan}} \times \text{x pengenceran} \times \text{volume larutan sampel (ml)} \over 1000$$

Kadar asam askorbat dalam sampel (%) :

$$\frac{\text{Berat dalam sampel}}{\text{Volume sampel}} \times \frac{100}{1000}$$

Lampiran 6

Sertifikat analisis asam askorbat

FROM : PT ENSEVAL PUTRA MEGA TRADING FAX NO. : 46822459 DEC. 06 2000 12:16PM P1

Takeda

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
HEAD OFFICE
1-1, Doshimachi 4-chome, Chuo-Ku
OSAKA, JAPAN

Article: Ascorbic Acid USP/BP/EP/FCC "Fine Granular"
Lot No.: HRSP387

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Test Item	Specifications	Date	Results
Appearance	White to almost white crystals or crystalline powder	JUNE 22, 2000	Pass
Odor	Odorless or almost odorless		Pass
Identification	Positive		Positive
Appearance of the solution	Within BP limit		Pass
Specific rotation	Between +20.5° and +21.5°		Pass(+21.0)
Copper	Not more than 5 ppm		Pass
Iron	Not more than 2 ppm		Pass
Heavy metals	Not more than 10 ppm		Pass
Arsenic	Not more than 3 ppm		Pass
Lead	Not more than 5 ppm		Pass
Oxalic acid	Within BP limit		Pass
Residue on ignition (Sulphated ash)	Not more than 0.1%		Pass(0.0%)
Content	Not less than 99.0% and not more than 100.5%		Pass(100.0%)
Particle size data			-
Thru U.S. No.20	100%		Pass(100%)
Thru U.S. No.30	Not less than 95%		Pass(100%)
On U.S. No.100	Not less than 90%		Pass(94%)
Organic volatile impurities	Meets USP requirements		Pass(by process validation)

Manufacturing date: JUNE 22, 2000

We hereby certify that the above-mentioned Ascorbic Acid USP/BP/EP/FCC "Fine Granular" (Lot No. HRSP387) was analyzed and approved by our Quality Control Department.

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

H. Nako

CHIEF SCIENTIST - HIROSHI NAKO

Lampiran 7

Sertifikat analisis magnesium askorbyl fosfat



Spec-Chem Ind.

No.90 East Zhongshan Road
Nanjing, P.R.of China
Zipcode, 210002

Tel: +86 25 84521390 84523391
Fax: +86 25 84520790 84520791
Email: specchem@jionline.com

P.O. No.: DLA/09/002/I
NPWP No.: 01.333.770.4-035.000

Certificate of Analysis

Batch No.	081204
Quantity	10 Kg
Manufacturing Date	Dec 04, 2008
Expiry Date	Dec 03, 2010
Analysis Date	Dec 05, 2008

Magnesium Ascorbyl Phosphate

Items	Standards	Results
Appearance	Pale yellow powdery solid	Complies
Color of 3% solution	APHA number not more than 70	APHA60
Transparency of 3% solution	Transparent	Complies
pH value (3% solution)	7.0-8.5	8.21
Assay (HPLC)	Not less than 98.5%	99.10%
Loss on drying	Not more than 20.0%	10.40%
Cl	Not more than 0.35%	0.28%
Specific rotation [α]D ²⁵	+43° to +50° (c=2)	+48.5°
Total bacteria	Not more than 100 pcs/g	<10
As	Not more than 2 ppm	<1.5 ppm
Pb	Not more than 20 ppm	<4.0 ppm
Conclusion	Complies to standards	Complies

Q.C. Manager: Su Liang

Inspector: 02

Lampiran 8

Sertifikat analisis natrium askorbil fosfat

FROM : RAMAKO

PHONE NO. : 62216342707

NOV. 14 2007 03:57PM P1



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Productcode : 5000858
Lot No. : UIE00606017
Analysis No. : 04191608

Test	Result	Limits / Specifications	Dimension / Units
Appearance	white powder	white powder off-white powder	
Identity	corresponds	corresponds	
Purity	98.9	min. 95.0	%
Ascorbic acid content	46.4	min. 45.0	%
Colour of a solution in water (10pc)	almost colourless	colourless almost colourless	
Colour			
Clarity of a solution in water (10pc)	clear	clear	
Clarity			
Water	9.9	8.0 to 11.0	%
Water	9.2	9.0 to 10.0	
pH of a solution in water (3pc)			
pH			
Heavy Metals	<10	<10	ppm
Heavy Metals			
Arsenic	<2	<2	ppm
Arsenic			

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

DSM Nutritional Products France
The Quality Assurance Manager

Ph. Legrand

Philippe Legrand

DSM Nutritional Products France
BP 170
F-68 305 Saint-Louis Cedex
Téléphone +33 (0) 3 89 69 69 00

1 / 1

Date of issue : 15-Jun-2006