



**PEMISAHAN DAN PENENTUAN TIAMIN DAN RIBOFLAVIN DALAM
SUPLEMEN MAKANAN MENGGUNAKAN TEKNIK HPLC**

Asal:	Hadiah	Klasifikasi
SKRIPSI	Pembelian	S
Terima Tel :	07 AUG 2007	S43
No. Induk		NUR
KLASIR / PENYALIN :	<i>ju</i>	P
		C.1

Diajukan untuk Memenuhi Persyaratan Penyelesaian Program Sarjana Sains
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

Oleh:
Nurlaelah
NIM. 021810301012

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2007**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

Ayahanda, Bapak Saepudin & Ibunda Odah tersayang, yang telah mendoakan setiap waktu dan memberi cinta dan kasih sayang serta pengorbanan selama ini,

Teh Ida & A Adi, Callista & Nazwa, terimakasih selalu memberikan saran dan motivasi selama ini, serta semua bantuan selama ini,

Adikku tersayang Mella, untuk semua doa yang dipanjatkan serta pengorbanan selama ini ,

My Best Friend, Novi, & Evi

Sahabat terbaikku dalam setiap keadaan, baik jauh ataupun dekat.

Thanks dah ngasih saran, kritik n motivasi selama ini.

Nita, thanks 4 Beauty and style course. Wulan, kapan ke ciwidey bareng n shopping bareng di bdg?? Tia, thanks bgt dah bnyk ngebantu. Wisuda brg y!! Neni, smoga smoga bisa ketemu idolamu, Spain!!

Estu, thanks dah banyak ngebantu selama ini. Bima, thanks buat printer nya.

All Chemist'02

(Tri,Intan,Hari,Ricoh,Amir,Rusman,Wahid,Ali,Egik,Rochma,Anis,Ari,Any, Hanif,Eko), dan temen” yg gak bisa disebutin satu”. Always kompak!!

Anak Kosan Jawa Iva/19

(Febri,Ika,Hartik,Nevi,Nunik,Diah,Puri,Rossy,Chu,Fitri,Nia)

thanks 4 Canda & Tawa selama ini.

Almamaterku Universitas Jember

MOTTO

Elemen terpenting kita bukan pada otak.
Namun, pada apa yang menuntut otak kita Yaitu kepribadian, hati, kebaikan
dan ide-ide progresif
(Fyodor Dostoyevsky)

Sebuah jiwa yang dinamis harus melalui setiap ketakutan yang dapat
dibayangkan sebelum mencapai pencerahan, karena tidak ada cara lain untuk
sampai ditempat terang itu tanpa melalui kegelapan
(Laura Esquivel)

Langkah pertama untuk melangkah menuju tujuan adalah
Dengan membuat keputusan bahwa anda tidak akan tinggal diam
ditempat anda berada sekarang ini
(John J.B. Morgan dan Ewing T. Webb)

Saya tidak akan pernah mencapai cita-cita saya,
Jika saya tidak pernah mencobanya
(Garth Brooks)

Untuk mencapai kesuksesan, sangatlah penting untuk mengetahui bagaimana
mengkonsentrasikan energi yang kita miliki, bagaimana berhemat dengannya,
dan bagaimana memfokuskan pada hal-hal yang penting
(Michael Korda)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurlaelah

NIM : 021810301012

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: “*Pemisahan dan Penentuan Tiamin dan Riboflavin dalam Suplemen Makanan Menggunakan Teknik HPLC*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juli 2007
Yang menyatakan,



Nurlaelah
NIM. 021810301012

SKRIPSI

**PEMISAHAN DAN PENENTUAN TIAMIN DAN RIBOFLAVIN DALAM
SUPLEMEN MAKANAN MENGGUNAKAN TEKNIK HPLC**

Nurlaelah

NIM. 021810301012

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Drs. Zulfikar, Ph.D

Dosen Pembimbing Anggota : Asnawati, S.Si., M.Si.

SKRIPSI

**PEMISAHAN DAN PENENTUAN TIAMIN DAN RIBOFLAVIN DALAM
SUPLEMEN MAKANAN MENGGUNAKAN TEKNIK HPLC**

Nurlaelah

NIM. 021810301012

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Drs. Zulfikar, Ph.D

Dosen Pembimbing Anggota : Asnawati, S.Si., M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pemisahan dan Penentuan Tiamin dan Riboflavin dalam Suplemen Makanan Menggunakan Teknik HPLC” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam - Universitas Jember pada:

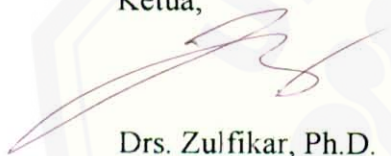
Hari : JUM' AT

Tanggal : 3 AUG 2007

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam - Universitas Jember

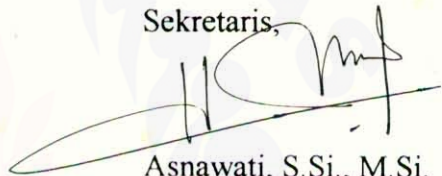
Tim Penguji

Ketua,



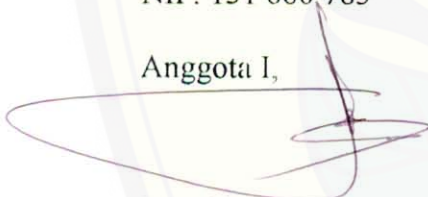
Drs. Zulfikar, Ph.D.
NIP. 131 660 785

Sekretaris,



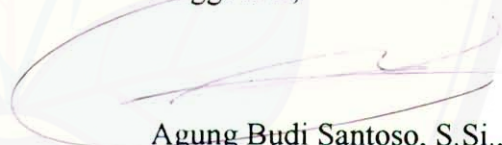
Asnawati, S.Si., M.Si.
NIP. 132 240 146

Anggota I,




Drs. Siswoyo, M.Sc., Ph.D.
NIP. 132 056 180

Anggota II,



Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si.
NIP. 132 207 812

Mengesahkan
Dekan,



Ir. Sumadi, M.S.
NIP. 130 368 784

RINGKASAN

Pemisahan dan Penentuan Tiamin dan Riboflavin dalam Suplemen Makanan Menggunakan Teknik HPLC; Nurlaelah, 021810301012; 2007: 44 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Vitamin merupakan senyawa organik kompleks yang dibutuhkan dalam jumlah sangat kecil dan umumnya tidak dapat disintesis oleh tubuh, kebutuhan vitamin hanya dapat dipenuhi melalui makanan. Tiamin dan riboflavin sangat penting karena dibutuhkan pada reaksi metabolisme karbohidrat. Kedua vitamin ini banyak ditemukan pada tumbuhan serealia, maupun dalam suplemen makanan. HPLC dapat digunakan untuk Analisis vitamin B karena memiliki selektivitas yang tinggi, dapat menganalisis dengan waktu yang singkat dan dapat mengukur secara kualitatif maupun kuantitatif.

Parameter optimasi dipelajari untuk mendapatkan hasil pemisahan yang baik. Parameter optimasi yang digunakan yaitu pH larutan buffer, kecepatan laju alir dan komposisi eluen. Hasil optimum diperoleh pada 0,005 M K_2HPO_4 pH-4, laju alir 1,4 mL per menit dan konsentrasi metanol 15 %. Identifikasi senyawa dalam sampel dapat dilakukan dengan membandingkan waktu retensi senyawa larutan standar dengan waktu retensi sampel yang diperoleh. Waktu retensi tiamin adalah 5,4 menit dan riboflavin adalah 12,53 menit. Pemisahan pada kondisi optimum menghasilkan puncak yang memiliki daya pisah yang baik yaitu 5,67 yang menunjukkan bahwa pada kondisi ini terjadi pemisahan dan tidak ada tumpang tindih puncak yang dihasilkan. Limit deteksi untuk tiamin adalah 0,48 ppm dari konsentrasi 10 hingga 40 ppm, sedangkan limit deteksi untuk riboflavin adalah 1,33 ppm dari konsentrasi 5 hingga 20 ppm. Besarnya kandungan tiamin yang diperoleh dalam sampel adalah 1,61 mg dalam tiap gram sampel dan riboflavin yang diperoleh sebesar 0,38 mg dalam tiap gram sampel.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “*Pemisahan dan Penentuan Tiamin dan Riboflavin dalam Suplemen Makanan Menggunakan Teknik HPLC*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, untuk itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ir. Sumadi, M.S., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember,
2. Ketua jurusan kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas jember,
3. Ketua laboratorium kimia analitik, yang telah memberikan ijin penelitian,
4. Drs. Zulfikar, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Asnawati, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini,
5. Drs. Siswoyo, M.Sc., Ph.D., dan Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si., selaku penguji yang telah memberikan kritik dan saran sebagai evaluasi penulisan skripsi ini,
6. Bambang Piliharto, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik selama menjadi mahasiswa,
7. Teknisi dan Staff Jurusan Kimia, Mas Budi, Bu Harti, Mas Darma, Mas Dul, Mba Sari, yang telah memberikan pelayanan selama ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tiamin	5
2.1.1 Struktur Tiamin	5
2.1.2 Sifat Tiamin	5
2.1.3 Teknik Analisis Vitamin B ₁ (Tiamin)	6

2.2 Riboflavin	6
2.2.1 Struktur Riboflavin	6
2.2.2 Sifat Riboflavin	7
2.2.3 Teknik Analisis Vitamin B ₂ (Riboflavin)	7
2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	8
2.3.1 Fase Gerak	9
2.3.2 Pompa	12
2.3.3 Injektor	12
2.3.4 Kolom	13
2.3.5 Detektor	15
2.3.6 Pencatat sinyal	17
2.4 Kromatografi Fase Balik (Reversed Phase Chromatography)	17
2.4.1 Kolom <i>Reverse Phase</i>	17
2.5 Suplemen Makanan	19
2.6 Karakteristik Pemisahan Tiamin dan Riboflavin	20
2.6.1 Waktu Retensi	20
2.6.2 Efisiensi Kolom	21
2.6.3 Analisis Kuantitatif	21
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	24
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	24
3.2 Alat dan Bahan	24
3.2.1 Alat	24
3.2.2 Kondisi Kromatograf	24
3.2.3 Bahan	25
3.2 Diagram Alir Penelitian	25
3.4 Rancangan Penelitian	26
3.5 Prosedur Penelitian	26
3.5.1 Pembuatan Larutan Eluen	26
3.5.2 Preparasi Sampel	27

3.5.3 Preparasi larutan Standar	27
3.6 Parameter Optimasi	27
3.6.1 Efek Larutan Buffer	27
3.6.2 Efek Laju Alir	28
3.6.3 Efek Komposisi Eluen	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Preparasi Fase Gerak	29
4.2 Optimasi Pemisahan Tiamin dan Riboflavin	30
4.2.1 Efek Larutan Buffer	30
4.2.2 Efek Laju Alir	32
4.2.3 Efek Komposisi Eluen	34
4.3 Pemisahan Tiamin dan Riboflavin dalam Sampel	35
4.4 Karakteristik Pemisahan Tiamin dan Riboflavin dalam Sampel	37
4.4.1 Waktu Retensi	37
4.4.2 Resolusi (Daya Pisah)	37
4.4.3 Linieritas	38
4.4.4 Limit Deteksi	40
4.4.5 Sensitivitas	40
BAB 5. PENUTUP	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	45

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Fisika Pelarut yang Lazim Dipakai pada Kromatografi Cair.....	10
2.2 Buffer yang umum digunakan pada HPLC	11
2.3 Oktadesilsilan untuk kolom kromatografi fase balik	15
2.4 Fase diam untuk HPLC dan struktur kimianya	19
3.1 Variasi perbandingan komposisi eluen	26
4.1 Kandungan senyawa yang terdapat dalam sampel.....	36
4.2 Waktu retensi dan resolusi (daya pisah) pemisahan dalam sampel	37

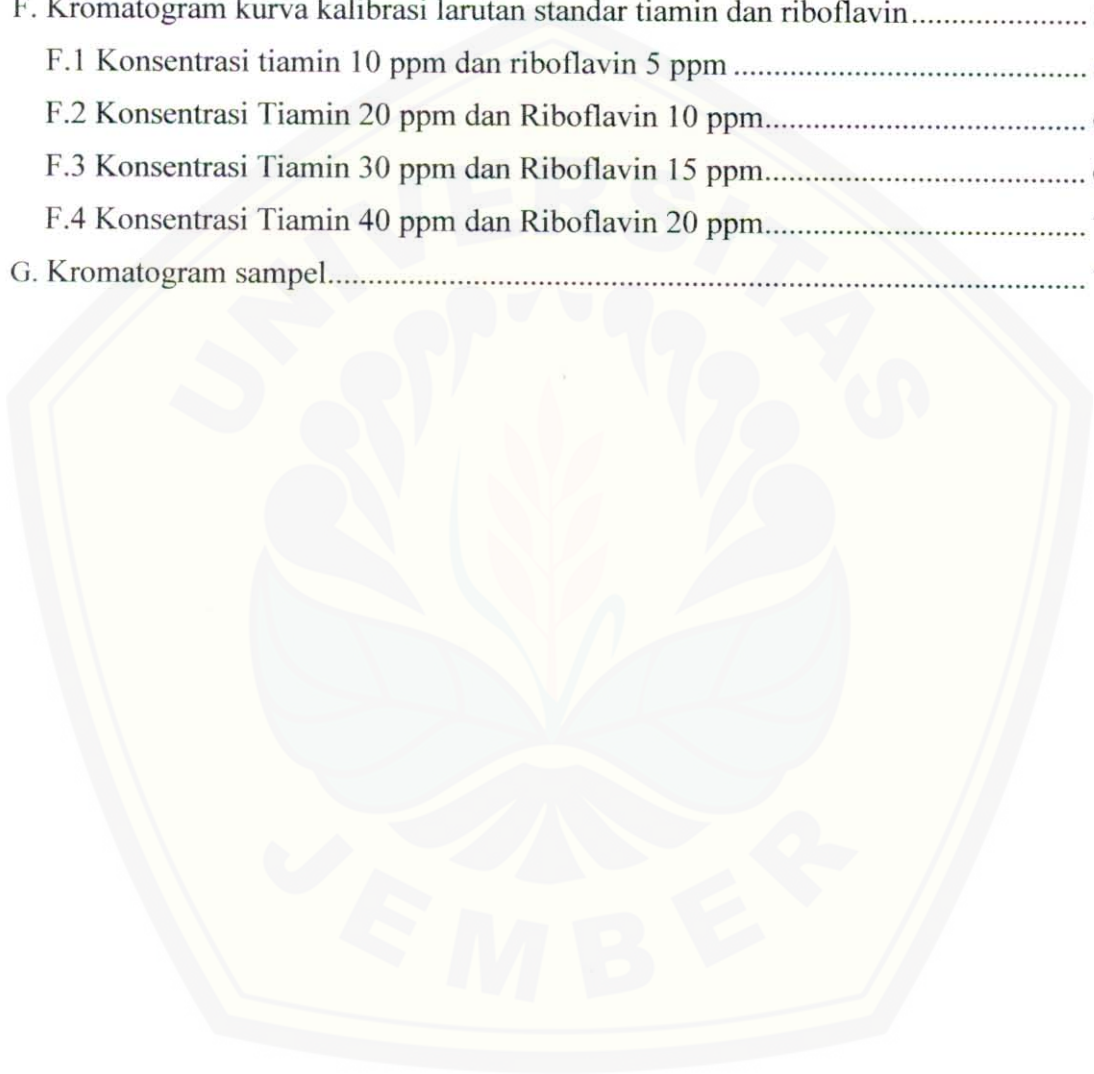
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur Tiamin	5
2.2 Srtuktur Riboflavin.....	7
2.3 Instrumentasi HPLC.....	9
2.4 Tipe katup injeksi.....	13
2.5 Septum untuk injeksi dengan syringe	13
2.6 Reaksi Preparasi Kromatografi Fase balik.....	18
3.1 Skema Diagram Alir Penelitian	25
3.2 Digital Ultrasonic Cleaner CD-3800 (A)	26
4.1 Grafik efek larutan buffer.....	31
4.2 Puncak kromatogram, (a) dengan adanya tailing pada pH 7, (b) tanpa adanya tailing pada pH 4	31
4.3 Grafik korelasi antara laju alir dengan waktu retensi.....	33
4.4 Grafik efek laju alir	33
4.5 Grafik korelasi antara konsentrasi metanol dengan waktu retensi.....	34
4.6 Grafik efek komposisi eluen	35
4.7 Kromatogram dengan puncak yang tumpang tindih (<i>Overlap</i>)	35
4.8 Kromatogram pemisahan tiamin dan riboflavin dalam sampel	37
4.9 Grafik kurva kalibrasi larutan standar tiamin.....	39
4.10 Grafik kurva kalibrasi larutan standar riboflavin	39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Optimasi pemisahan tiamin dan riboflavin	45
A.1 Tabel Data dan grafik Efek Larutan Buffer	45
A.2 Tabel Data dan Efek Laju Alir (<i>Flow Rate</i>)	46
A.3 Tabel Data dan grafik Efek Komposisi Metanol	47
B. Kurva kalibrasi larutan standar tiamin dan riboflavin	49
B.1 Tabel data dan grafik kurva kalibrasi larutan standar Tiamin	49
B.2 Tabel Data dan grafik Kurva Kalibrasi Larutan Standar Riboflavin	50
C. Tabel data pengukuran sampel	51
C.1 Resolusi (daya pisah)	51
C.2 Limit Deteksi	52
D. Perhitungan kadar tiamin dan riboflavin dalam sampel	54
D.1 Kadar tiamin dalam Sampel	54
D.2 Kadar Riboflavin dalam sampel	54
E. Kromatogram optimasi pemisahan tiamin dan riboflavin	55
E.1 Efek Larutan Buffer	55
E.1.1 Buffer pH 7	55
E.1.2 Buffer pH 6	56
E.1.3 Buffer pH 5	57
E.1.4 Buffer pH 4	58
E.2 Efek laju alir	59
E.2.1 Laju Alir 1,2	59
E.2.2 Laju Alir 1,4	60
E.2.3 Laju alir 1,6	61
E.3 Efek Komposisi Eluen	62

E.3.1 Konsentrasi Metanol 10 %	62
E.3.2 Konsentrasi Metanol 10 %	63
E.3.3 Konsentrasi Metanol 20%	64
E.3.4 Konsentrasi Metanol 25 %	65
F. Kromatogram kurva kalibrasi larutan standar tiamin dan riboflavin.....	66
F.1 Konsentrasi tiamin 10 ppm dan riboflavin 5 ppm	66
F.2 Konsentrasi Tiamin 20 ppm dan Riboflavin 10 ppm.....	67
F.3 Konsentrasi Tiamin 30 ppm dan Riboflavin 15 ppm.....	68
F.4 Konsentrasi Tiamin 40 ppm dan Riboflavin 20 ppm.....	70
G. Kromatogram sampel.....	71





BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Vitamin merupakan senyawa organik kompleks yang dibutuhkan dalam jumlah sangat kecil dan tidak dapat disintesis oleh tubuh, kebutuhan vitamin hanya dapat dipenuhi melalui makanan.

Berdasarkan sifat kelarutannya, vitamin dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok, yaitu vitamin yang larut dalam air dan vitamin yang larut dalam lemak. Vitamin B tergolong ke dalam vitamin yang larut dalam air. Berdasarkan sifat dan fungsinya, vitamin B termasuk dalam kelompok vitamin yang disebut vitamin B-kompleks (Winarno, 2002).

Vitamin B-kompleks terdiri atas sepuluh faktor yang saling berkaitan fungsinya di dalam tubuh dan terdapat di dalam bahan makanan yang hampir sama. Beberapa vitamin B penting yang ditemukan pada makanan antara lain adalah vitamin B₁ (tiamin) dan vitamin B₂ (riboflavin).

Dalam bentuk pirofosfatnya, tiamin merupakan koenzim piruvat dehidrogenase yang mendekarboksilasi piruvat secara oksidasi membentuk asetil-koenzim A. Zat ini merupakan koenzim yang sangat penting yang mengkatalisis tahap penghubung antara glikolisis dan daur krebs. Tiamin juga merupakan koenzim transketolase, yang mentransfer serpihan dua karbon antara karbohidrat pada jalur pentosa fosfat. Riboflavin merupakan suatu pembawa elektron utama, sebagai komponen flavina-adenina dinukleotida (FAD) yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat dan asam lemak.

Tiamin adalah turunan pirimidinilmetil tiazolium yang banyak terdapat pada kulit padi, kacang-kacangan, kuning telur, ragi serta dalam sayuran. Kekurangan tiamin akan menyebabkan polineuritis atau yang lebih dikenal dengan beri-beri yang disebabkan terganggunya transmisi syaraf atau jaringan syaraf yang menderita kekurangan energi. Riboflavin adalah turunan benzopteridina yang mempunyai rantai samping ribitil (ribosa yang tereduksi). Kekurangan riboflavin dapat menyebabkan penyakit ariboflavinosis (Winarno, 2002). Vitamin ini terdapat dalam hampir semua makanan, yang terbanyak ditemukan dalam telur, daging, bayam, hati, ragi dan susu. Vitamin B juga banyak ditemukan dalam suplemen makanan.

Suplemen makanan merupakan makanan yang mengandung zat-zat gizi dan non-gizi; bisa dalam bentuk kapsul, kapsul lunak, tablet, bubuk, atau cairan yang fungsinya sebagai pelengkap kekurangan zat gizi yang dibutuhkan untuk menjaga agar vitalitas tubuh tetap prima. Sebagai pelengkap, suplemen makanan bukan diartikan sebagai pengganti makanan kita sehari-hari. Di Indonesia, suplemen makanan dimasukkan dalam golongan makanan dan bukan obat yang diatur dalam Peraturan Menteri Kesehatan No.239/Menkes/per/XII/76.

Berbagai metode telah dikembangkan untuk menentukan vitamin B, antara lain; elektrokimia (Zhao *et al.*, 1996), spektrofotometri (Ortega-Barrales *et al.*, 1998), spektrofotometri (Liu *et al.*, 1998), teknik kromatografi *normal phase* dan *reversed phase* TLC (Navas *et al.*, 1993 dan Hushan *et al.*, 1994) dan *capillary electrophoresis* (Dinelli *et al.*, 1994).

Kamman *et al.*, (1980) menggunakan panjang gelombang 254 nm untuk mendeteksi tiamin, riboflavin dan niasin. Fellman *et al.*, (1982) telah melaporkan pemisahan *reversed-phase* menggunakan kolom C-18 untuk menentukan tiamin dan riboflavin di dalam makanan termasuk susu. Metode ini membutuhkan penghilangan zat-zat pengotor dengan menggunakan buffer fosfat 0,01 M.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) adalah teknik yang banyak digunakan untuk pemisahan vitamin, karena memiliki selektivitas tinggi (De Lenheer *et al.*, 1985) cepat dan akurat (Toma *et al.*, 1979).

Saat ini teknik HPLC menggunakan kolom C-₁₈ μ -bondapak dengan fase gerak K₂HPO₄-metanol belum banyak dikembangkan, sehingga penelitian menggunakan kolom C₁₈ μ -bondapak dengan eluen K₂HPO₄-metanol dalam pemisahan dan analisis tiamin dan riboflavin dalam sampel suplemen makanan cukup menjanjikan untuk dikembangkan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

- a. bagaimana kondisi optimum pemisahan tiamin dan riboflavin menggunakan teknik HPLC?,
- b. bagaimana karakteristik pemisahan tiamin dan riboflavin menggunakan teknik HPLC?,
- c. berapa kandungan tiamin dan riboflavin dalam suplemen makanan?.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

- a. tiamin dan riboflavin dianalisis dengan teknik HPLC menggunakan kolom C-₁₈ bondapak, dan K₂HPO₄- metanol sebagai fase gerak,
- b. pengukuran dilakukan dengan menggunakan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm untuk tiamin dan riboflavin,
- c. sampel yang digunakan adalah suplemen makanan.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah :

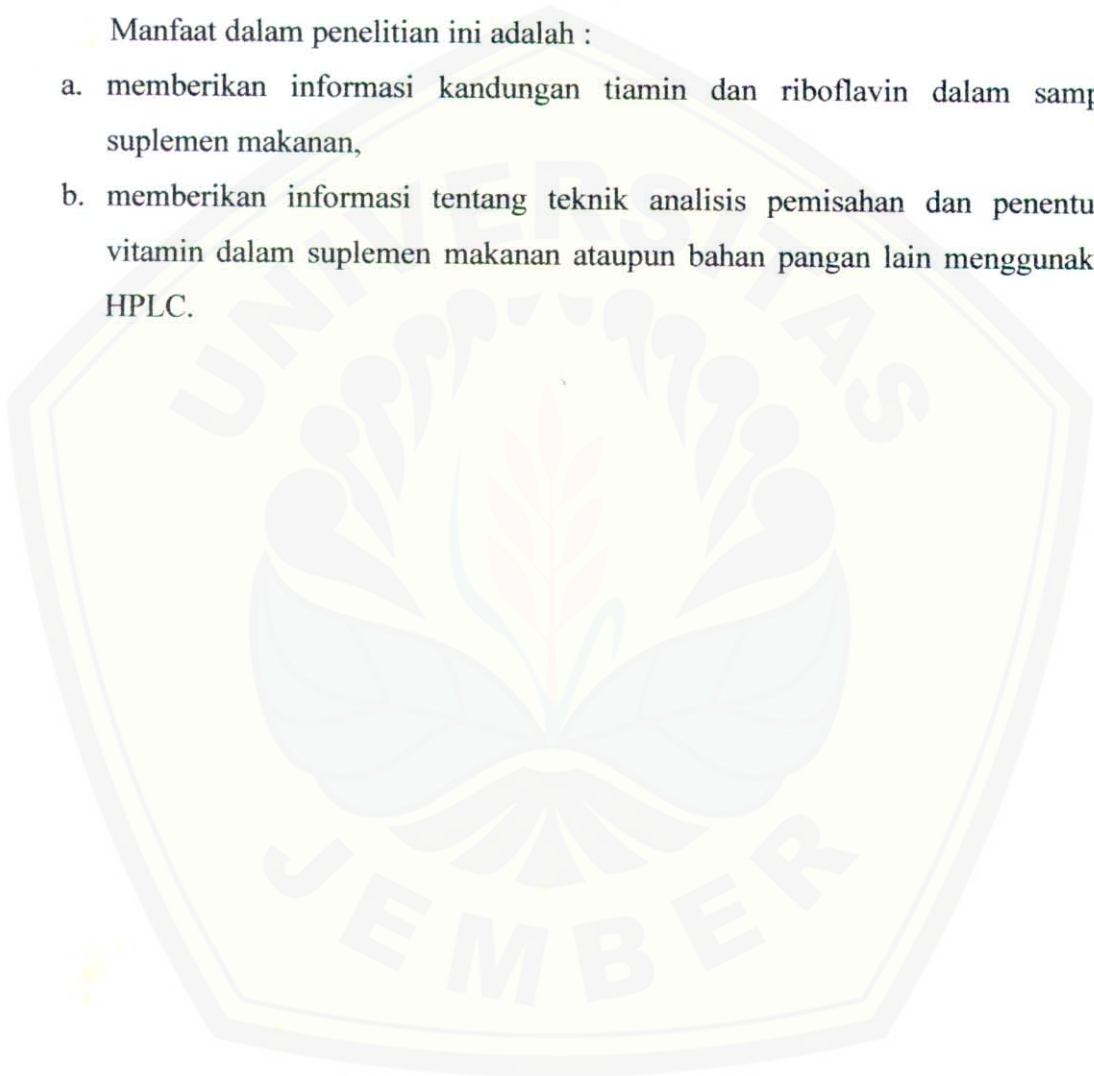
- a. mengetahui kondisi optimum pemisahan tiamin dan riboflavin menggunakan teknik HPLC,
- b. mengetahui karakteristik pemisahan tiamin dan riboflavin menggunakan teknik HPLC,

- c. mengetahui kandungan tiamin dan riboflavin dalam sampel suplemen makanan.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dalam penelitian ini adalah :

- a. memberikan informasi kandungan tiamin dan riboflavin dalam sampel suplemen makanan,
- b. memberikan informasi tentang teknik analisis pemisahan dan penentuan vitamin dalam suplemen makanan ataupun bahan pangan lain menggunakan HPLC.



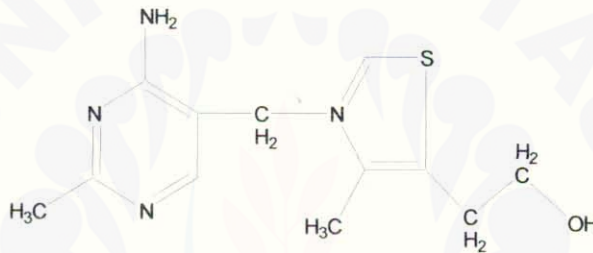


BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tiamin

2.1.1 Struktur Tiamin

Vitamin B1 atau Tiamin terdiri dari cincin pirimidin dan cincin tiazol yang dihubungkan melalui satu rantai karbon. Tiamin mempunyai nama yaitu 3-[(4-amino-2-metil-5-pirimidinil)metil]-5-(2-hidroksietil) metiltiazolium.



Sumber: Andarwulan, 1992.

Gambar 2.1 Struktur Tiamin.

2.1.2 Sifat Tiamin

Bentuk hidroklorida tersedia dalam dunia perdagangan, sejenis kristal putih, padat dan stabil dalam bentuk kering, larut dalam air dan agak larut dalam alkohol 95% (Marsetyo, 1991). Tiamin merupakan basa kuat, tiamin hidroklorida dapat menyerap radiasi *ultraviolet* dimana absorpsi maksimumnya tergantung dari nilai pH. pH 7 atau lebih larutan tiamin hidroklorida menyerap radiasi UV dan menghasilkan dua puncak panjang gelombang maksimum yaitu pada 235 dan 267 nm, sedangkan pada pH 5,5 atau kurang, panjang gelombang maksimumnya adalah 245-247 nm. Tiamin cukup stabil dalam larutan asam kuat. Tiamin hidroklorida murni pada pH 3,5 dapat dipanaskan sampai 120 °C tanpa terjadi dekomposisi yang berarti, tetapi dalam larutan asam lemah molekul tiamin dapat terdekomposisi. Tiamin sangat sensitif

dengan adanya pengaruh temperatur dan dapat mengalami dekomposisi Pada pH netral dan basa (Andarwulan dan Koswara, 1992).

2.1.3 Teknik Analisis Vitamin B₁ (Tiamin)

1. Metode Tiokrom

Larutan vitamin B₁ dapat dioksidasi dengan kalium feri sianida membentuk tiokrom yang bersifat fluoresen. Tiokrom yang dibentuk dapat diekstrak dengan isobutanol dan diukur dengan metode foto elektrik. Oksidasi terjadi pada pH 10. Metode ini hanya dapat menentukan jumlah tiamin bebas dalam bahan pangan, karena hanya tiokrom bebas yang dapat diekstrak dengan pelarut organik. Kesulitan ini dapat diatasi dengan hidrolisa sampel dengan enzim pepsin yang diikuti dengan hidrolisa menggunakan taka-diafase.

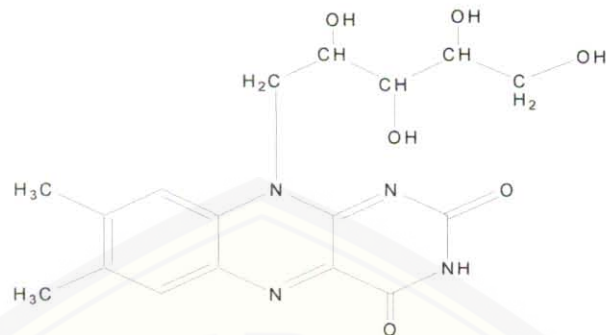
2. Metode Kalorimetri

P-amino-asetanilid dan p-amino asetofenone (metil-p-amino-asetofenon) dapat bereaksi dengan vitamin B₁ membentuk warna merah. Reaksi ini spesifik untuk vitamin B₁ dan senyawa berwarna merah tersebut dapat diekstraksi dengan pelarut organik seperti xylen, aseton, isobutanol, dan lain-lain. Sensitivitas reaksi ini akan meningkat dengan adanya fenol atau etil alkohol, terutama jika ada kedua senyawa tersebut. Adanya vitamin C dapat mengganggu reaksi ini dan pengaruhnya dapat dihilangkan dengan titrasi menggunakan iodine atau dengan penambahan ion-ion kalsium.

2.2 Riboflavin

2.2.1 Struktur Riboflavin

Riboflavin (C₁₇H₂₀N₄O₆) atau Vitamin B₂ disebut juga vitamin G. Dibidang kimia terdapat dua nama yang diberikan pada vitamin B₂ yaitu 6,7-dimetil-9-(D-1'-ribitol) iso-aloksazin dan 6,7-dimetil-9-D-riboflavin. Riboflavin merupakan turunan dari isoaloksazin dengan rantai samping ribitol (Andarwulan dan Koswara, 1992).



Sumber: Andarwulan, 1992.

Gambar 2.2 Struktur Riboflavin

2.2.2 Sifat Riboflavin

Riboflavin murni berbentuk kristal jarum berwarna kuning-oranye dan mempunyai titik leleh 282 °C. Riboflavin murni sangat mudah larut dalam air (12 mg dalam 100 mL air pada 27,5 °C atau 14 mg pada 40 °C), amil alkohol, sikloheksanol, fenol, amil asetat dan sangat larut dalam larutan alkali. Riboflavin tidak larut dalam aseton, eter, benzena dan kloroform. Bentuk tidak murni ternyata jauh lebih mudah larut dibandingkan senyawa murninya. Riboflavin mempunyai spektrum yang khas dengan panjang gelombang maksimum pada 445, 372, 269, dan 225 nm. Riboflavin sangat tidak stabil dalam bentuk larutan. Dekomposisinya sangat dipengaruhi oleh cahaya, suhu, dan pH larutan. Riboflavin terdekomposisi dengan cepat dalam larutan basa. Riboflavin mempunyai derajat ketahanan panas yang relatif tinggi, pemanasan 120° C selama 6 jam hanya menyebabkan sedikit kerusakan (Andarwulan dan Koswara, 1992).

2.2.3 Teknik Analisis Vitamin B₂ (Riboflavin)

1. Pengukuran Polarografik

Teknik polarografik dapat digunakan untuk menentukan kadar vitamin B₂. Metode ini menghasilkan hasil yang baik untuk larutan vitamin B₂ yang relatif

murni dan penelitian lebih lanjut masih harus dilakukan untuk menentukan kadar riboflavin dalam produk-produk alami.

2. Pengukuran Spektrum Absorpsi

Penentuan spektrum absorpsi sinar ultra violet untuk vitamin B₂ hanya cocok untuk larutan riboflavin murni, hal ini pun masih mempunyai kelemahan karena sangat peka terhadap cahaya. Pengukuran vitamin B₂ terdistruksi sebagian, dan merusakkan vitamin B₂ selama pengukuran dimulai memperbesar penyimpangan hasil pengukuran.

2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Istilah kromatografi pertama kali diperkenalkan oleh ilmuwan botani Rusia *Mikhail Semenovic Tswett* pada tahun 1908. Kromatografi berasal dari kata *chroma* yang berarti “warna” dan *graphien* yang berarti “penulisan”. Dimana pada mulanya kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan fisik karena memanfaatkan perbedaan kecil dari sifat fisik komponen yang akan dipisahkan (Mulja, dan Surahman, 1994).

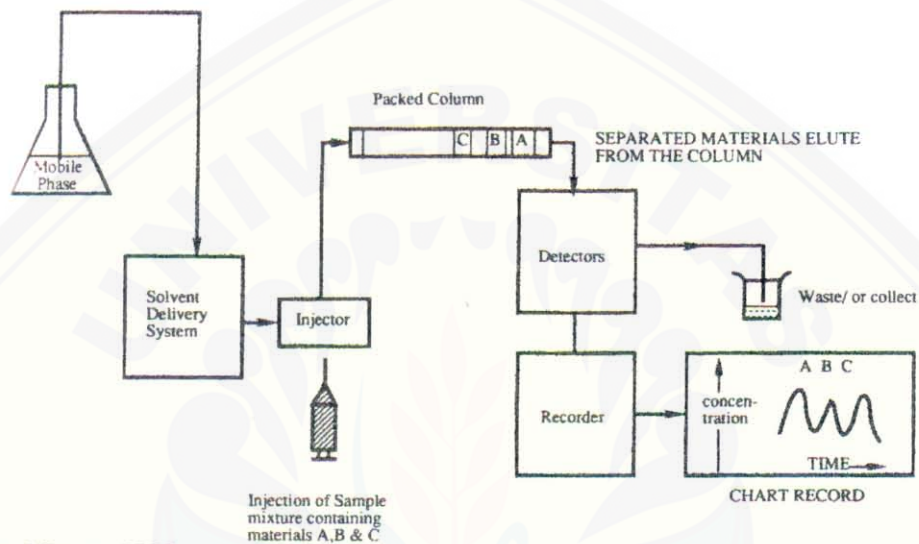
Kromatografi merupakan teknik pemisahan komponen suatu campuran berdasarkan kecepatan komponen ketika melewati suatu fasa diam dengan bantuan fasa gerak baik berupa cairan atau gas (Skoog dan Holler, 1963).

Teknik pemisahan kromatografi memiliki *fleksibilitas* yang cukup tinggi. Analisis data dari teknik kromatografi dapat dioptimalisasi dengan jalan mengatur dan mempelajari sifat fisik dari analit yang dianalisis. Instrumen kromatografi yang sering digunakan adalah HPLC (Gritter *et al.*, 1985).

HPLC merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. HPLC termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fasa gerak cairan dan fasa diam cairan atau padat. Metode ini memiliki banyak kelebihan jika dibandingkan dengan metode lainnya, antara lain:

1. mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran,
2. mudah melaksanakannya,

3. kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi,
4. dapat dihindari terjadinya dekomposisi atau kerusakan bahan yang dianalisis,
5. resolusi yang baik,
6. dapat digunakan bermacam-macam detektor,
7. kolom dapat digunakan kembali.



Sumber: Meyer, 1992.

Gambar 2.3 Instrumentasi HPLC.

2.3.1 Fase Gerak

Kemampuan HPLC dalam memisahkan senyawa tergantung pada keanekaan fase gerak. Fase gerak pada HPLC sangat berpengaruh pada tambahan zat terlarut dan pemisahan komponen dalam campuran.

Kromatografi cair komposisi dari solven atau fase gerak adalah salah satu dari variabel yang mempengaruhi pemisahan. Terdapat variasi yang sangat luas pada solven yang digunakan untuk HPLC, tetapi ada beberapa sifat umum yang sangat disukai, yaitu fase gerak harus:

1. murni, tidak terdapat kontaminan (pengganggu),
2. tidak bereaksi dengan kolom,

3. sesuai dengan detektor,
4. melarutkan sampel,
5. memiliki viskositas rendah.

Tabel 2.1. Sifat Fisika Pelarut yang Lazim Dipakai pada Kromatografi Cair.

Pelarut	Terputus (nm)	Indeks Bias	Tetapan Dielektrik
Kepolaran Meningkat			
n-Pentana	205	1.358	1.844
n-heptana	197	1.388	1.924
Sikloheksana	200	1.427	2.023
Karbon Tetraklorida	265	1.466	2.238
n-Butil Klorida	220	1.402	7.39
Kloroform	295	1.443	4.806
Benzena	280	1.501	2.284
Toluena	285	1.496	2.379
Diklorometana	232	1.426	9.08
Tetrakloroetilena	280	1.938	3.42
1,2-Dikloroetana	225	1.445	10.65
2-Nitropropana	380	1.394	25.52
Nitrometana	380	1.394	35.87
n-Propil eter	200	1.381	3.39
Etil asetat	260	1.37	6.02
Eter	215	1.353	4.34
Metil asetat	260	1.362	6.68
Aseton	330	1.359	20.7
Tetrahidrofuran	225	1.408	7.58
n-Propanol	205	1.38	20.3
Etanol	205	1.361	24.6
Metanol	205	1.329	33.6
Air	180	1.333	80.3

Sumber: Gritter *et. al*, 1991.

Kandungan utama fase gerak pada *reversed phase* adalah air. Pelarut yang dapat campur dengan air seperti metanol, asetonitril, dioksan, tetrahidrofuran dan dimetil formamida ditambahkan untuk mengatur kepolaran fase gerak. (Mulja dan Surahman, 1995).

Tabel 2.2 Buffer yang umumnya digunakan pada HPLC.

Buffer	Range pH
Potassium Dihidrogen Fosfat	1,1-1,3
Dipotassium Hidrogen Fosfat	6,2-8,2
Tripotassium Fosfat	11,3-13,3
Sodium Dihidrogen Sitrat	2,1-4,1
Disodium Hidrogen Sitrat	3,7-5,7
Trisodium Sitrat	4,4-6,4
Sodium asetat	3,8-5,8
TRIS [Tris(Hidroksimetil)aminometan]	3,8-5,8
Ammonium Klorida	8,0-10,1
Buffer Volatil	
Ammonium Format	3,0-5,0
Pyridinium format	3,0-5,0
Ammonium Asetat	3,8-5,8
Ammonium Karbonat	4,0-6,0

Sumber: Meyer, 1992.

Pasangan pelarut yang paling lazim dipakai dalam kromatografi fase terbalik ialah air-metanol dan air asetonitril. Metanol adalah pelarut sangat murni, mudah didapat dan berhasil baik pada banyak pemisahan. Ada beberapa kekurangannya, seperti: viskositasnya yang tinggi cenderung menurunkan koefisien kolom; sukar bercampur dengan cuplikan non polar; dan volume campur kecil (artinya 1 volume MeOH dan 1 volume H₂O tidak menghasilkan 2 volume campuran). Viskositas yang tinggi dapat diatasi sedikit dengan melakukan kromatografi pada suhu yang dinaikkan, akan tetapi suhu yang dinaikkan digabung dengan fase berair yang lazim dipakai dapat memperpendek masa pakai kolom fase terikat siloksan (Johnson dan Stevenson, 1991).

Menghilangkan udara pada solven (*degassing*), terutama untuk HPLC yang menggunakan pompa bolak balik sangat diperlukan terutama bila detektor tidak tahan tekanan sampai 100 psi. Udara yang terlarut yang tidak dikeluarkan akan menyebabkan gangguan yang besar di dalam detektor sehingga data yang diperoleh

tidak dapat digunakan. *Degassing* juga sangat baik bila menggunakan kolom yang sangat sensitif terhadap udara (contoh: kolom berikatan dengan NH_2).

2.3.2 Pompa

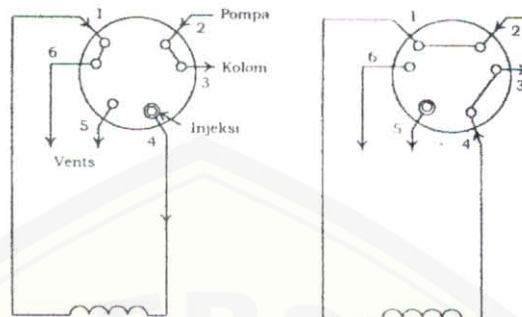
Pompa diperlukan untuk mengalirkan pelarut sebagai fase gerak dengan kecepatan dan tekanan yang tetap. Tekanan yang digunakan tergantung dari ukuran kolom dan viskositas dari pelarut.

Fase gerak dalam HPLC adalah suatu cairan yang bergerak melalui kolom. Ada dua tipe pompa yang digunakan, yaitu tekanan konstan dan pemindahan konstan. Pemindahan konstan dapat dibagi menjadi dua, yaitu: pompa *reciprocating* dan pompa *syringe*. Pompa *reciprocating* menghasilkan suatu aliran yang berdenyut teratur, oleh karena itu membutuhkan peredam pulsa atau peredam elektronik untuk menghasilkan *base line* detektor yang stabil, bila detektor sensitif terhadap aliran. Keuntungan utamanya ialah ukuran reservoir tidak terbatas. Pompa *syringe* memberikan aliran yang tidak berdenyut, tetapi reservoirnya terbatas (De Lux putra, 2006).

2.3.4 Injektor

Pada waktu sampel diinjeksikan ke dalam kolom, diharapkan agar aliran pelarut tidak mengganggu masuknya keseluruhan sampel ke dalam kolom. Sampel dapat langsung dimasukkan ke dalam kolom (*on column injection*) atau digunakan katup injeksi, saat sampel diinjeksikan ke dalam *holding loop* seperti yang terlihat pada gambar 2.4 Aliran pelarut dari pompa kemudian dialirkan melalui *loop* yang seterusnya akan mendesak sampel masuk ke ujung kolom.

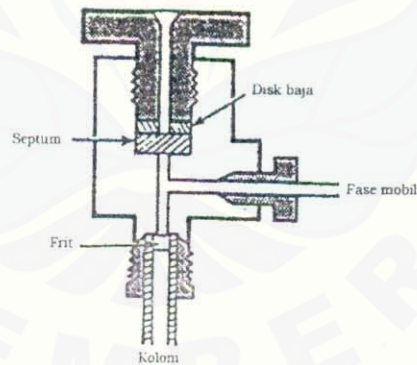
Loop yang mempunyai volume antara 10-20 μl dapat dipenuhi oleh sampel. Dalam hal ini akan dapat dihasilkan presisi yang tinggi. Kelemahan penggunaan injektor dengan *loop* ialah bahwa sampel diinjeksikan ke dalam fase gerak yang letaknya tidak di ujung kolom. Injektor dengan *loop* dapat memberikan tendensi terjadinya pelebaran puncak (*band broadening*).



Sumber: Macrae, 1988.

Gambar 2.4 Tipe Katup Injeksi.

Injeksi langsung ke dalam kolom dapat dilakukan dengan *syringe*. Injeksi dengan *syringe* dapat dilakukan melalui septum atau tanpa septum. Penampang septum untuk injeksi seperti terlihat pada gambar 2.5, dengan cara ini dapat diperoleh efisiensi pemisahan yang sangat tinggi.



Sumber: Hamilton dan Sewell, 1982.

Gambar 2.5 Septum untuk Injeksi dengan *Syringe*.

2.3.4 Kolom

Kolom adalah jantung kromatografi, berhasil atau gagalnya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai. Kolom pada

HPLC merupakan bagian yang sangat penting sebab separasi komponen-komponen sampel akan terjadi di dalam kolom. Hal penting yang harus diperhatikan dengan seksama adalah sebagai berikut:

1. pemilihan kolom yang sesuai,
2. pemeliharaan kolom,
3. uji terhadap spesifikasi kolom.

Kolom akan menjadi kunci penentu keberhasilan pemisahan komponen-komponen sampel serta hasil akhir analisis dengan HPLC. Kolom HPLC dapat dibuat dari:

1. bahan metal anti korosif dan tahan zat kimia,
2. bahan gelas tahan zat kimia,
3. bahan gelas yang dilapisi bahan metal.

Kolom dibuat dengan diameter sangat kecil (kolom mikro), dibuat dengan tujuan agar:

1. kepekaan menjadi lebih teliti,
2. menghemat larutan pengembang (eluen),
2. memperluas kemampuan detektor,
3. sampel yang dianalisis sedikit.

Kolom dibuat pendek dengan tujuan:

1. menghasilkan resolusi yang baik,
2. memperkecil harga diameter rata-rata partikel fase diam,
3. waktu retensi t_R , t_m menjadi singkat (mengurangi bagian instrumentasi HPLC terhadap hasil pemisahan).

Fase diam merupakan cairan yang dilapiskan pada permukaan zat padat penyangga dan dipakai sebagai bahan isian (*packing material*) untuk kolom. Ikatan antara zat padat penyangga dan fase stasioner dapat berupa ikatan fisik maupun ikatan kimiawi.

Ada dua tipe bahan isian yang ada di pasaran, yaitu *pellicular beads* dan *microporous particle*. *Pellicular beads* terdiri dari bagian dalam yang padat tak berpori, yang biasanya dari bahan silika dan kulit luar tipis yang bersifat porous. *Microporous particle* yang disebut juga *mikropartikel*, kini telah dibuat dengan ukuran yang kecil yaitu antara 3-10 μm . Ukuran yang kecil tersebut dapat memberikan luas permukaan yang besar, yaitu antara 200-300 m^2/g . ukuran kecil kolom dengan isian mikropartikel mempunyai efisiensi yang lebih tinggi. Hal ini disebabkan karena jumlah plat teoretik dapat mencapai 10.000 dalam kolom sepanjang 25 cm (Adnan, 1997).

Tabel 2.3 Oktadesilsilan untuk Kolom Kromatografi Fase Terbalik

Nama	Material Dasar	Rata-rata dp (μm)	Coverage
Finepak SIL C ₁₈	Finepak SIL	10	-
LiChrosorb RP18	LiChrosorb Si	5, 10	22 % karbon
RSIL C ₁₈ HL	RSIL	5, 10	18 % karbon
RSIL C ₁₈ LL	RSIL	5, 10	9 % karbon
Polygosil C ₁₈	Polygosil	5,7,5,10	11 % karbon
μ -Bondapak C ₁₈	mporasil	10	10% karbon
Vydac 201 C ₁₈	Vydac TP	5, 10	10 % karbon
Nucleosil C ₁₈	Nucleosil 100	5, 7, 5,10	15 % karbon
Separon Si C ₁₈	Separon	5, 10	20 % karbon
Chromagabond MC ₁₈	LiChrosorb Si-60	10	20 % karbon
Microsil C ₁₈	Microsil	7.5	~18 % karbon
Radial-pak C ₁₈	Radial-pak Si	10	-
Spherosil -C ₁₈	Spherosil	5,7	20-23 % karbon

Sumber: Ahuja, 1989.

2.3.5 Detektor

Sebagian besar senyawa mempunyai serapan khusus pada daerah *ultraviolet*, juga pada sinar tampak maka cara spektrometri ini dapat digunakan (Adnan, 1997).

Detektor HPLC yang umum digunakan adalah detektor UV 254 nm, kebanyakan senyawa-senyawa poliaromatik menyerap sinar *ultraviolet* dengan baik.

Detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor merupakan salah satu komponen dalam instrumen kromatografi yang berfungsi sebagai media pendeteksian komponen analit yang telah dipisahkan dari kolom kromatografi. Jenis-jenis detektor yang digunakan dalam kromatografi sangat beragam, pemakaian dan pemilihan detektor harus disesuaikan dengan jenis analit yang dipisahkan, sifat fisik analit (ionisasi, berat molekul, konduktivitas panas, foto ionisasi, dan sebagainya) serta jenis pemisahan yang terjadi didalam kolom kromatografi.

Detektor yang baik memiliki sensitivitas yang tinggi, gangguan (*noise*) yang rendah, kisaran respons linier yang luas, dan memberi respons untuk semua tipe senyawa. Suatu kepekaan yang rendah terhadap aliran dan fluktuasi temperatur sangat diinginkan, tetapi tidak selalu dapat diperoleh.

Radiasi absorpsi oleh *solute* sebagai fungsi konsentrasi, *c* digambarkan melalui Hukum Lambert-Beer.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon cb$$

Keterangan:

A= Absorbansi

c = konsentrasi sampel dalam mol/L

ϵ = absorptivitas molar

I_0 = kekuatan sinar jatuh

I = kekuatan sinar yang dipancarkan.

Detektor ultraviolet tidak bekerja jika pelarut tidak mengandung kromofor ultraviolet (benzena atau toluena dan yang lainnya) jika zat terlarut tidak mempunyai serapan ultraviolet (Gritter *et al.*, 1991).

2.3.6. Pencatat Sinyal (Recorder)

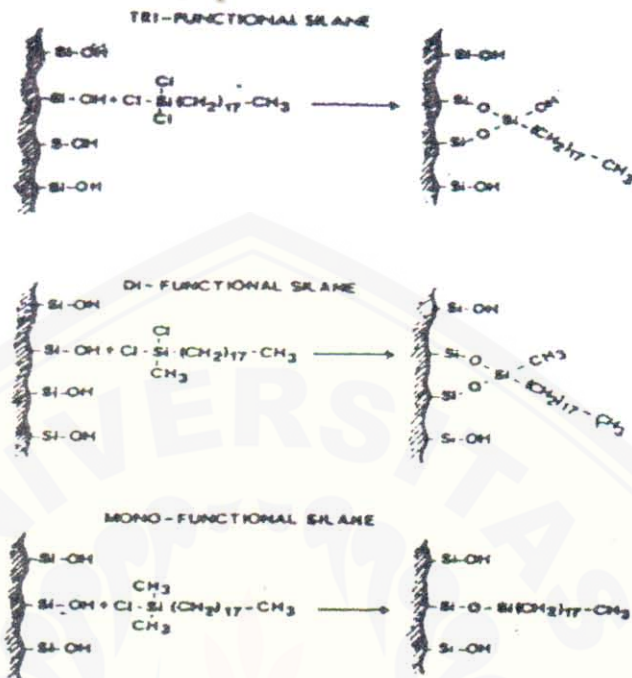
Tingkat keakurasian suatu kromatogram pada suatu daerah pembacaan ditentukan oleh pemilihan pencatat sinyalnya (*recorder*). Ada kalanya sinyal perlu diperkuat. Kepekaan perekam adalah 10 mV dan berjangkauan dari 1-10 mV. Kadangkala mutlak diperlukan penguatan sinyal. Dalam operasional saluran langsung dua elektrometer dibangun menjadi satuan sinyal (Khopkar, 2002).

2.4 Kromatografi Fase Balik (*Reversed phase chromatography*)

Kromatografi bentuk ini, fase gerak lebih polar dari pada fase diam. Cara ini selektifan sering kali sangat berbeda dengan selektifan pada pemisahan fase normal. Urutan elusi biasanya berkaitan dengan sifat kehidrofoban pelarut yang meningkat. Umumnya makin mudah zat terlarut larut dalam air, maka makin cepat terelusi.

2.4.1 Kolom *Reverse phase*

Untuk mendapatkan fase yang non polar silika gel direaksikan dengan klorosilan Cl-Si-(R)_n . Fase diam yang non polar yang banyak dipakai adalah jenis C_{18} , C_8 , C_2 . Reaksi terbentuknya fase diam nonpolar (*reversed phase*) (gambar 2.6)



Sumber: Mulja *et.al*, 1995.

Gambar 2.6 Reaksi Preparasi Kromatografi Fase balik.

Walaupun ada kemasan dengan rantai alkil yang panjangnya bermacam-macam, kemasan yang paling populer ialah kemasan yang mempunyai lapisan monomer Oktadesilsilan. Kolom micropak MCH atau μ -bondapak C_{18} berguna untuk berbagai jenis cuplikan, baik polar maupun non polar. Kemasan ini menunjukkan transfer energi yang cepat dan menghasilkan kolom yang sangat efisien (Johnson dan Stevenson, 1991).

walaupun vitamin E dari bahan alami jauh lebih baik penyerapannya daripada yang sintetis (Elvina, 1998).

Suplemen makanan digolongkan sebagai *nutraceutical*, sedangkan obat-obatan masuk golongan *pharmaceutical*. Berbeda dengan obat-obatan yang harus diuji efektivitasnya secara klinis mengikuti serangkaian prosedur, suplemen makanan ini khasiatnya tidak perlu dibuktikan melalui uji klinis. Saat ini jenis *nutraceutical* boleh dijual secara bebas tapi tidak diklaim memiliki khasiat untuk mengobati penyakit seperti halnya obat-obatan. Di Indonesia suplemen makanan dimasukkan dalam golongan makanan dan bukan obat yang diatur dalam Peraturan Menteri Kesehatan No. 329/Menkes/Per/XII/76.

2.6 Karakteristik Pemisahan Tiamin dan Riboflavin

2.6.1 Waktu Retensi (*Time Retention*)

Waktu Retensi adalah selang waktu yang diperlukan oleh solute mulai saat di injeksikan ke dalam kolom sampai keluar dari kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detektor, dinyatakan oleh t_R . Waktu retensi akan berbanding terbalik dengan kecepatan alir eluen. Semakin lambat kecepatan alir eluen maka semakin besar nilai waktu retensi, dan sebaliknya. Hasil dari waktu retensi dan kecepatan alir eluen disebut volume retensi, ini merupakan parameter retensi yang lebih umum. Volume retensi, V_R menggambarkan volume eluen dari komponen partikel tertentu yang bergerak melewati kolom.

Komponen volume retensi dibedakan menjadi dua bagian :

1. Volume retensi yang berkurang (*reduced retention volume*), merupakan jumlah eluen yang bergerak melewati kolom beberapa lama setelah komponen berada di permukaan.
2. Dead volume, V_o merupakan jumlah eluen yang bergerak melewati kolom ketika komponen bergerak bersama dengan fase cair.

Volume Retensi tidak berhubungan dengan kecepatan alir analit, tetapi bergantung pada parameter geometrik pada kolom. Komponen yang sama akan

memberikan V_R yang berbeda jika menggunakan kolom yang berbeda dengan jenis absorban yang sama.

Parameter retensi adalah perbandingan volume retensi dan dead volume (k)

$$k = \frac{V_R}{V_o}$$

Kapasitas kolom di dalam sistim HPLC tidak tergantung pada parameter geometrik dari kolom. Ini dianggap sebagai karakteristik termodinamik dari sistim absorban-analit-eluen. Disajikan dalam persamaan berikut :

$$k' = \frac{V_R - V_o}{V_o}$$

2.6.2 Efisiensi Kolom

Efisiensi kolom berhubungan dengan lebar puncak. Lebar puncak tergantung pada beberapa parameter yaitu kekuatan kolom, kecepatan alir dan ukuran partikel. Kecepatan alir merupakan satu parameter yang dapat bergerak dari satu tempat ke tempat lain pada kolom yang sama. Fenomena tersebut dapat dinyatakan dalam efisiensi kolom.

2.6.3 Analisis Kuantitatif

1. Linieritas

Linier range merupakan daerah (*range*) konsentrasi analit tertentu pada grafik absorban terhadap konsentrasi yang memberikan respon linier dimana kenaikan absorban berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi (Skoog dan Holler, 1963). Respon linier ditunjukkan melalui persamaan garis sebagai berikut:

$$y = bx + a$$

Keterangan :

b = slope atau kemiringan dari kurva kalibrasi

a = intersep atau perpotongan terhadap sumbu y

(Caulcut dan Boddy, 1983).

2. Limit Deteksi

Limit Deteksi adalah konsentrasi terkecil dari suatu analit yang masih dapat dideteksi/diukur (Kateman *et al.*, 1993). Limit deteksi diperoleh melalui rumus:

$$S_B = \frac{S_y}{x} = \left\{ \frac{\sum |y - \hat{y}|^2}{n-2} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$\text{Limit Deteksi}(X_{LOD}) = \frac{c - Y_{LOD}}{m}$$

Dimana Y_{LOD} adalah serapan/intensitas limit deteksi, Y_B adalah serapan/intensitas kurva kalibrasi, S_B adalah standar deviasi kurva kalibrasi, a adalah intersep persamaan kurva kalibrasi dan slope adalah gradient (b) kurva kalibrasi $y = bx + a$ (Miller *et al.*, 1992)

3. Sensitivitas

Menurut Ingle *et al.*, (1988), sensitivitas dapat dinyatakan sebagai slope dari kurva yang diperoleh dengan range tertentu nilai sensitivitas yang besar berarti bahwa perubahan konsentrasi yang kecil dari analit dapat memberikan respon yang berarti.

Sensitivitas suatu metode analisis harus diketahui batas kadar terkecil yang dapat ditentukan untuk analisis kuantitatif yang dikenal sebagai LOD (*limit of detection*). Sensitivitas metode analisis diusahakan meningkat dengan cara dua arah yaitu: dari sampel yang dianalisis atau dari instrumennya yang ditingkatkan.

4. Selektivitas dan Resolusi

Resolusi menggambarkan kekuatan pemisahan suatu partikel dalam satu komponen campuran di dalam sistim kromatografi yang lengkap. Resolusi (R) menyatakan perbandingan jarak rata-rata antara dua puncak maksimum dengan lebar puncak pada garis dasar.

Faktor Resolusi (R_s) antara puncak kromatografi dapat dihitung berdasarkan persamaan:

$$R_s = \frac{2\Delta t}{(W_2 + W_1)}$$

t_{r2} dan t_{r1} adalah waktu retensi pada dua komponen. Dan W_1 dan W_2 adalah lebar alas puncak antara dua komponen.

Selektivitas merupakan perbandingan dari faktor kapasitas pada dua puncak, atau perbandingan dari waktu retensi yang telah ditentukan. Selektivitas menggambarkan kekuatan pemisahan absorban yang telah bercampur dalam suatu komponen. Dinyatakan dengan persamaan berikut:

$$\alpha = \frac{V_{R,1} - V_o}{V_{R,2} - V_o} = \frac{k'_1}{k'_2}$$

Parameter ini tidak berhubungan dengan efisiensi kolom tetapi hanya bergantung pada komponen awal, jenis eluen, komposisi eluen dan permukaan kimia absorban.

5. Metode Luas Puncak

Luas puncak diukur dengan menggunakan metode triangulasi. Cara ini didasarkan bahwa puncak kromatografi menyerupai bentuk segitiga. Tinggi puncak diukur dari garis alas sampai ke titik potong garis singgung. Lebar alas dihitung sebagai jarak antara dua titik potong garis alas dengan kedua garis singgung. Luas dihitung dengan rumus triangulasi. Luas = 1/2 BH (Johnson dan Stevenson, 1991).



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Oktober 2006 sampai dengan Mei 2007 bertempat di Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah botol semprot, neraca analitik, gelas kimia, pH meter, gelas ukur (10mL, 50mL, dan 250mL), aluminium foil, pipet tetes, pipet volum (5mL, 10mL, 25mL, 50mL), labu erlenmeyer, labu ukur (100mL dan 250 mL), corong buchner, pipet mohr, bola pipet, *Digital Ultrasonic Cleaner* CD-3800 (A), Instrumentasi HPLC, detektor UV-Vis dari *Waters Associates* model 440 *absorbance detector*.

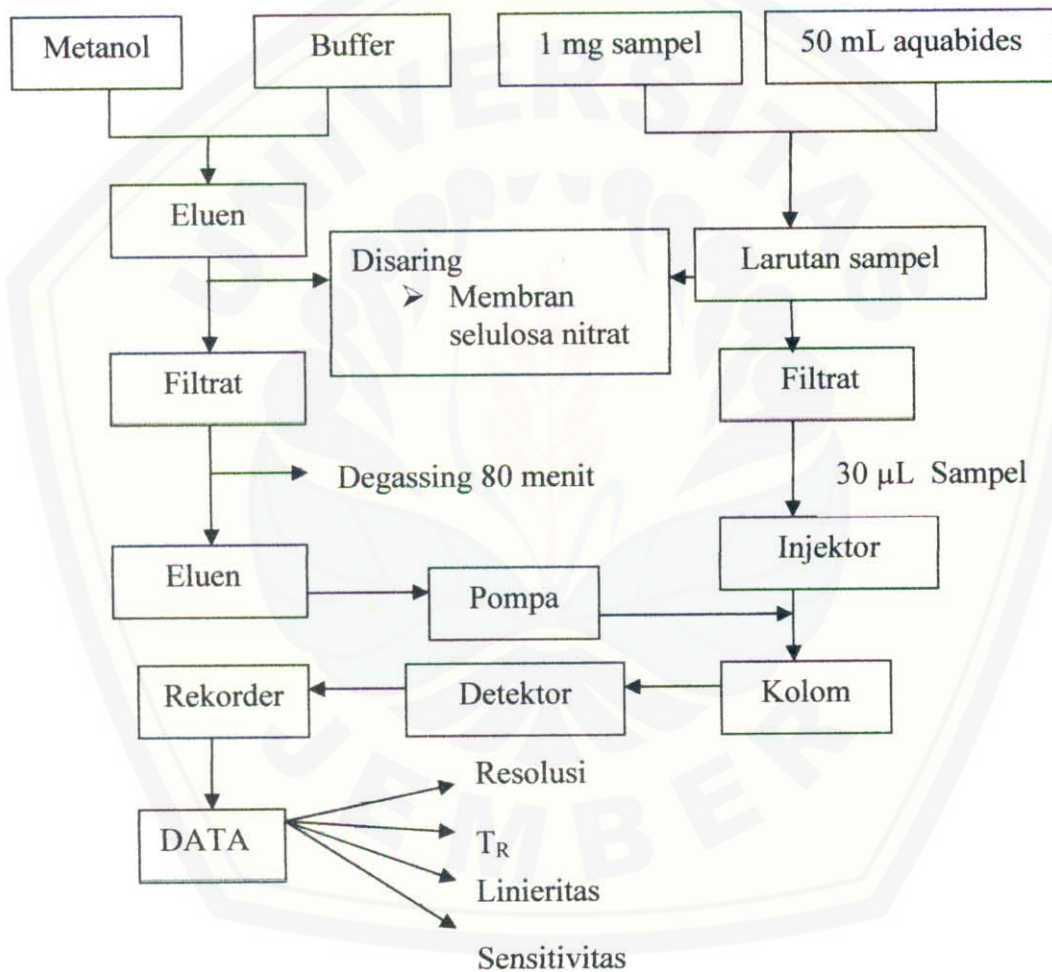
3.2.2. Kondisi Kromatograf

Peralatan utama yang dipakai dalam penelitian ini adalah Instrumentasi HPLC yang terdiri dari pompa penyalur pelarut buatan *Waters* Model 515 HPLC, tempat injeksi buatan *Waters* Model U6K, kolom yang digunakan dari *Waters Associates*, μ -bondapak C-₁₈ berukuran 3,9 x 300 mm dan Variasi kecepatan fase gerak adalah 1,2 hingga 1,6 mL/menit. Detektor yang digunakan adalah detektor UV-Vis dari *Waters Associates* model 440 *absorbance detector*. Deteksi dilakukan pada panjang gelombang 254 nm.

3.2.3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel suplemen makanan Sakatonik[®], larutan standar tiamin, larutan standar riboflavin, metanol, larutan buffer K_2HPO_4 0,005 M, dan aquabides.

3.3 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Skema Diagram Alir Penelitian.

3.4 Rancangan Penelitian

Pemisahan tiamin dan riboflavin dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu:

- pembuatan larutan eluen,
- preparasi larutan standar,
- preparasi sampel.

Rancangan penelitian yang digunakan untuk mempelajari faktor-faktor yang mempengaruhi dalam pemisahan dan penentuan tiamin dan riboflavin adalah sebagai berikut :

- komposisi metanol-air,
- variasi ph larutan buffer,
- kecepatan laju alir.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Larutan Eluen

Eluen atau fase gerak dalam penelitian ini dibuat dengan mencampurkan metanol dengan larutan buffer K_2HPO_4 0,005 M yang telah disaring menggunakan membran selulosa nitrat kemudian dilakukan proses *degassing* dalam *Digital Ultrasonic Cleaner* CD-3800 (A) selama 80 menit.



Gambar 3.2 *Digital Ultrasonic Cleaner* CD-3800 (A).

Tabel 3.1. Variasi perbandingan komposisi Eluen

Komposisi Eluen		pH larutan buffer	Kecepatan laju alir (Flow rate) (mL)	Ulangan
Metanol (%)	Buffer (%)			
25	75	7, 6, 5, 4	1,2; 1,4; 1,6	3 X
20	80	7, 6, 5, 4	1,2; 1,4; 1,6	3 X
15	85	7, 6, 5, 4	1,2; 1,4; 1,6	3 X

3.5.2. Preparasi Sampel

Sebanyak 1 gram sampel dilarutkan dalam 50 mL aquabides dan diaduk hingga homogen. Larutan sampel disaring menggunakan membran selulosa nitrat, dari filtrat yang diperoleh dilakukan proses degassing dalam *Digital Ultrasonic Cleaner* CD-3800 (A) selama 80 menit. 30 μ L larutan sampel diinjeksikan ke dalam injektor dan sinyal dari larutan sampel dapat dilihat pada *recorder*.

3.5.3. Preparasi Larutan Standar

1. Larutan Standar Tiamin

Larutan standar tiamin dapat disiapkan dengan memasukkan sebanyak 20 mg Tiamin kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquabides hingga tanda batas, kemudian disaring menggunakan membran selulosa nitrat.

2. Larutan Standar Riboflavin

Larutan standar riboflavin dapat disiapkan dengan memasukkan sebanyak 20 mg Tiamin kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquabides hingga tanda batas, kemudian disaring menggunakan membran selulosa nitrat.

3. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat dengan menyiapkan larutan standar pada berbagai konsentrasi. Larutan standar tiamin dibuat dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm. Larutan standar riboflavin dibuat dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm.

3.6 Parameter Optimasi

3.6.1 Efek Larutan Buffer

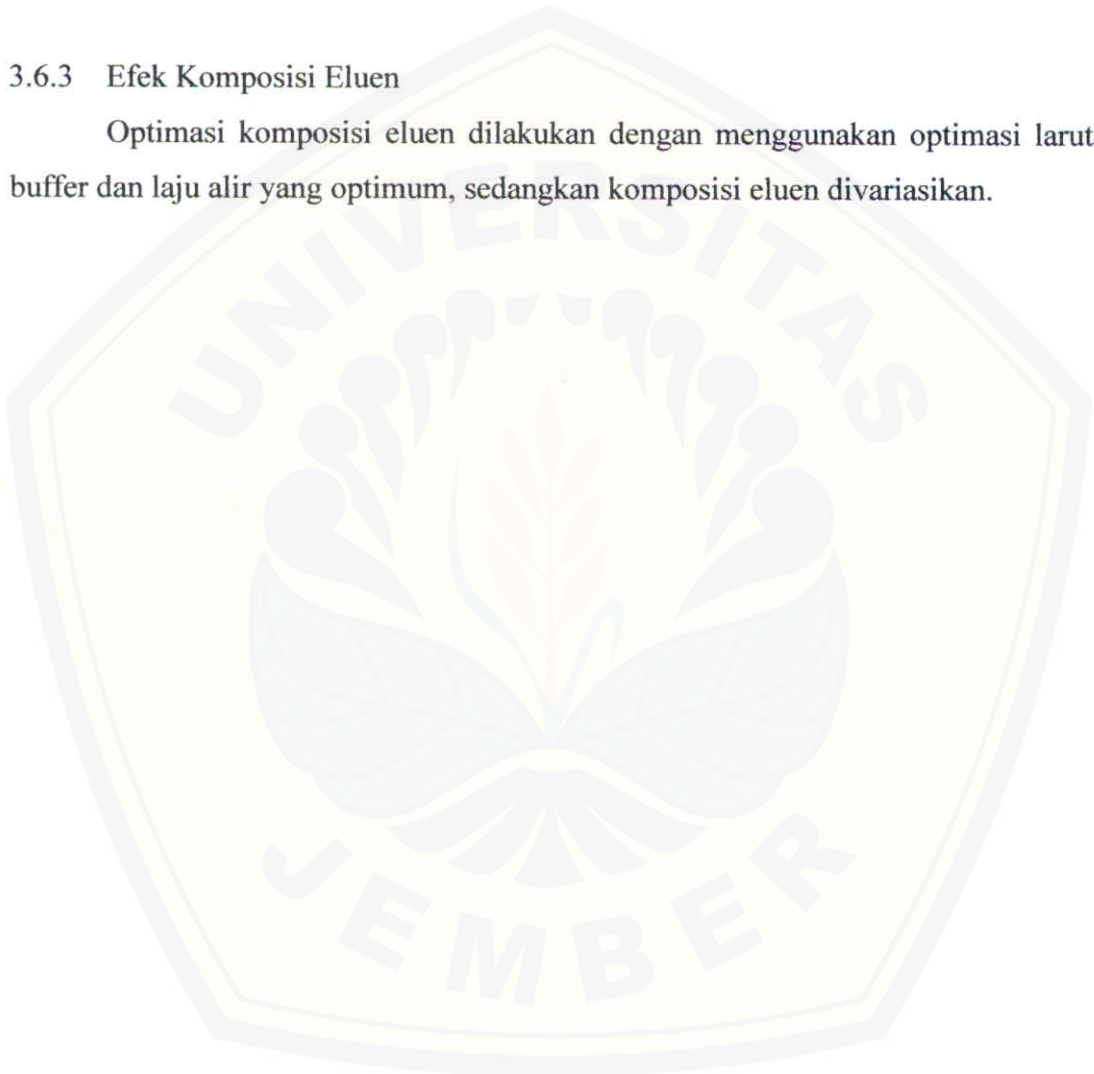
Optimasi larutan buffer dilakukan dengan menggunakan variasi pH larutan buffer, sedangkan konsentrasi eluen dan laju alir dijaga agar tetap konstan. Respon yang dihasilkan diperoleh dengan membandingkan luas puncak sinyal yang dihasilkan.

3.6.2 Efek Laju Alir

Optimasi kecepatan laju alir dilakukan dengan menggunakan kondisi optimal pengukuran pH larutan buffer dengan menggunakan variasi laju alir yang digunakan dan konsentrasi eluen dijaga agar tetap konstan.

3.6.3 Efek Komposisi Eluen

Optimasi komposisi eluen dilakukan dengan menggunakan optimasi larutan buffer dan laju alir yang optimum, sedangkan komposisi eluen divariasikan.





BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari uraian hasil dan pembahasan, maka kesimpulan penelitian ini adalah:

1. Kondisi optimum pemisahan tiamin dan riboflavin diperoleh pada titik optimum yaitu pada buffer pH 4, laju alir 1,4 mL per menit dan komposisi metanol 15 %.
2. Identifikasi senyawa dalam sampel dapat dilakukan dengan membandingkan waktu retensi senyawa larutan standar dengan waktu retensi sampel yang diperoleh. Waktu retensi tiamin adalah 5,4 menit dan riboflavin adalah 12,53 menit
3. Pemisahan pada kondisi optimum menghasilkan puncak puncak yang memiliki daya pisah yang baik yaitu 5,67 tidak terjadi *overlap* (tumpang tindih) pada kondisi ini.
4. Limit deteksi untuk tiamin adalah 0,48 ppm dari konsentrasi 10 hingga 40 ppm, sedangkan limit deteksi untuk riboflavin adalah 1,33 ppm dari konsentrasi 5 hingga 20 ppm.
5. Besarnya kandungan tiamin yang diperoleh dalam sampel adalah 1,61 mg dalam tiap gram sampel dan riboflavin yang diperoleh sebesar 0,38 mg dalam tiap gram sampel.

5.2 Saran

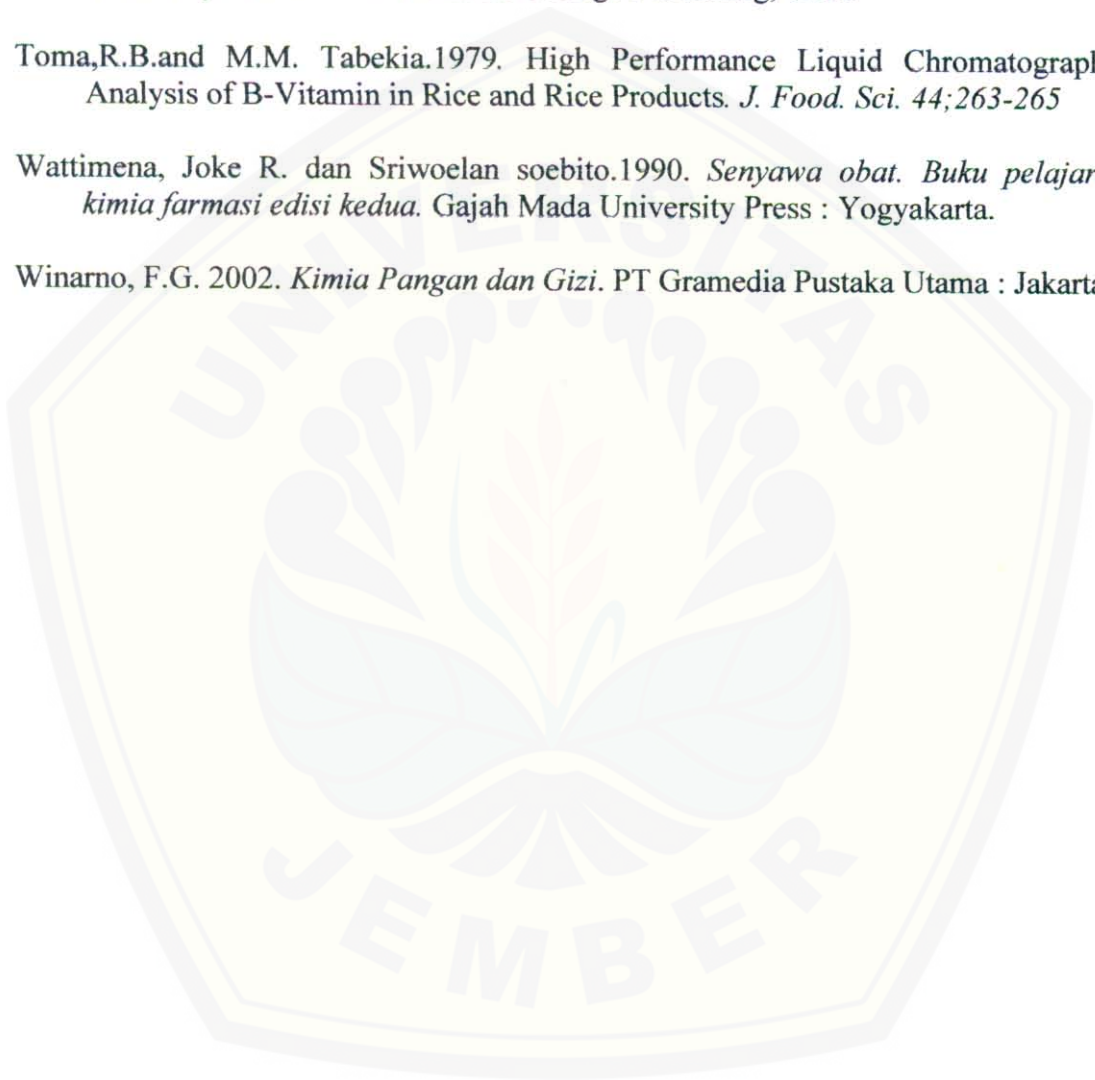
Penelitian lebih lanjut untuk analisis vitamin B dapat dikembangkan dengan menggunakan variasi eluen yang digunakan misalnya dengan menggunakan metanol:etanol:air sebagai eluen untuk dapat mempelajari polaritas eluen yang lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, Mochamad.1997. *Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Makanan*. Penerbit: andi yogyakarta.
- Ahuja, Satinder.1989. *Selectivity and Detectability optimizations in HPLC*. Wiley-interscience publication: New york.
- Amidzic, Rada. Jasmina Brboric. Olivera Cudina. 2005. "RP-HPLC Determination of Vitamin B₁, B₃, B₆, folic acid and B₁₂ In Multivitamin tablets". *J. Serb. Chem. Soc.* 70(10) P: 1229-1235.
- Andarwulan, Nuri dan Sutrisno Koswara.1992. *Kimia Vitamin*. Rajawali pers: Jakarta.
- Bidling Meyer, Brian A.1992. *Practical HPLC Methodology And Applications*. John Willey & sons, inc: New York.
- Calcut, R. And Boddy, R. 1983. "*Statistic for Analytical Chemistry*" London: Chapman and Hall.
- De Leenheer, A.P., W.E. Lambert., and M.G. De Vyter (Eds).1985. "Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins", 2nd edn, *Chrom.Sci.Series, Vol.30*, Marcel Dekker, inc., New York.
- De Lux putra, Effendy. 2006. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dalam Bidang Farmasi*. Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.
- Deutsch MJ.1984. "Vitamin and Other Nutrients". In: *Official Methods Of Analysis of the AQAC*, Williams S ed, 14th edn, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. P: 836-837
- Dinelli, Giovanni, and Alessandra Bonetti. 1994. "Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Analysis of Water-Soluble Vitamins and Multivitamin Integrators". *Willey interscience publication*; 15(1) , P: 1147-1150.

- Ekinci, R. And C. Kadakal. 2005. "Determination of Seven Water-Soluble Vitamin In Tarhana, A Traditional Turkish Cereal Food, By High Performance Liquid Chromatography". *J. Act. Chromatoggr.* No(15). P: 289-297.
- Gritter, J.Roy, James M. Bobbitt, Arthur E. Schawarting. 1991. Pengantar Kromatografi Edisi Kedua. Penerbit ITB: Bandung.
- Ingle, J.D.Jr and Crouch, S.R.1988. "Spectrometry Chemical Analysis ". USA: Prentice-Hall International, Inc.
- Johnson, Edward. L. and Robert Stevenson.1991. *Dasar Kromatografi Cair.* Bandung : Penerbit ITB.
- Kamman, J.F.,T.P.Labyza, and J.J. Warthesen.1980. " Thiamin and Riboflavin Analysis by High Performance Liquid Chromatography. *J. food Sci.*, P: 45:1487
- Karyadi, Elvina.1998. *Suplemen makanan untuk siapa?*. Indomedia.com
- Kateman, G. and Buydens, L.1993. *Quality Control In Analytical Chemistry.* USA: John Willey and Sons, Inc.
- Khopkar, S.M.1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik.* Jakarta: UI Press.
- Lindsay, S. 1992. *High Performance Liquid Chromatography. second edition,* John Wiley & Sons, Chischer, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Marsetyo dan Kartasapoetra.1991. *Ilmu Gizi (Korelasi gizi, Kesehatan dan Produktivitas kerja).* Jakarta: Rineka cipta.
- Meyers, RA. *Encyclopedia of Analytical Chemistry,* Volume 13, New York: John Wiley and Sons Ltd, 2000 :11428-11450
- Miller, J.C. and Miller, J.N. 1993. *Statistic For Analytical Chemistry.* England: Ellis Howard, PTP, Trentice Hall.
- Mulja, Muhammad. Dan Suharman. 1995. *Analisis instrumental.* Universitas Airlangga Press : Surabaya.
- Ortega-Barrales, P, M. L. Fernández-de Córdova, and A. Molina-Díaz.1998. Microdetermination of Vitamin B₁ in the Presence of Vitamins B₂, B₆, and B₁₂ by Solid-Phase UV Spectrophotometry. *J. Anal. Chem.*, 70(2), 271-275, ACS

- Snyder, L. R and Kirkland J.J 1979. *Introduction to Modern Liquid Chromatography second edition*. John Wiley & Sons.Inc NewYork, Chihester, Briebane, Toronto, Singapore.
- Skoog, D.A., West, D.M. and Holler, F.J.1963. *Fundamentals Of Analytical Chemistry. Six Edition*. Saunders College Publishing, USA.
- Toma,R.B.and M.M. Tabekia.1979. High Performance Liquid Chromatographic Analysis of B-Vitamin in Rice and Rice Products. *J. Food. Sci.* 44;263-265
- Wattimena, Joke R. dan Sriwoelan soebito.1990. *Senyawa obat. Buku pelajaran kimia farmasi edisi kedua*. Gajah Mada University Press : Yogyakarta.
- Winarno, F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT Gramedia Pustaka Utama : Jakarta.



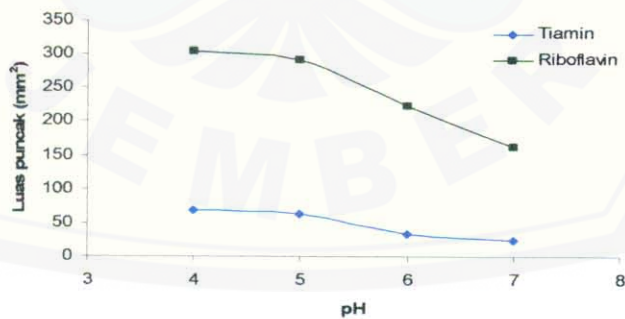
LAMPIRAN

LAMPIRAN A. OPTIMASI PEMISAHAN TIAMIN DAN RIBOFLAVIN

A.1 Tabel Data dan grafik Efek Larutan Buffer

pH	Ulangan	Waktu Retensi		Absorbansi		Luas Puncak	
		Tiamin	Riboflavin	Tiamin	Riboflavin	Tiamin	Riboflavin
4	1	4,2	9,8	0,001	0,005	76,5	313,5
	2	4,0	9,4	0,001	0,005	80	313,5
	3	4,2	9,8	0,001	0,004	49,5	283
						68,67	303,33
5	1	4,0	14,6	0,001	0,003	90	247,5
	2	4,0	15,0	0,000	0,003	55	266
	3	4,0	14,6	0,001	0,005	45	360
						63,34	291,16
6	1	5,2	18,6	0,000	0,003	35	238
	2	4,8	19,2	0,000	0,003	28	200
	3	5,2	18,2	0,000	0,003	38,5	232,5
						33,83	223,5
7	1	5,4	15,2	0,000	0,003	20	154
	2	4,8	15,2	0,000	0,003	31,5	192,5
	3	4,8	15,0	0,000	0,003	22,5	139,5
						24,67	162

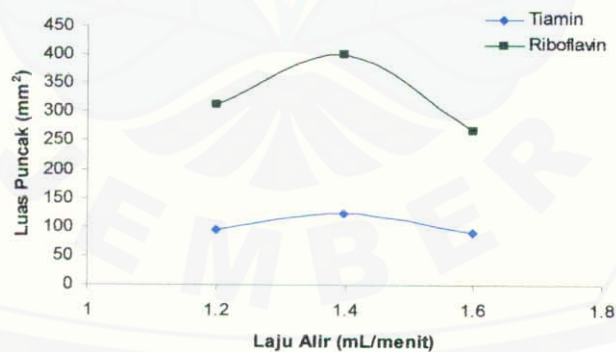
Grafik Efek Larutan Buffer

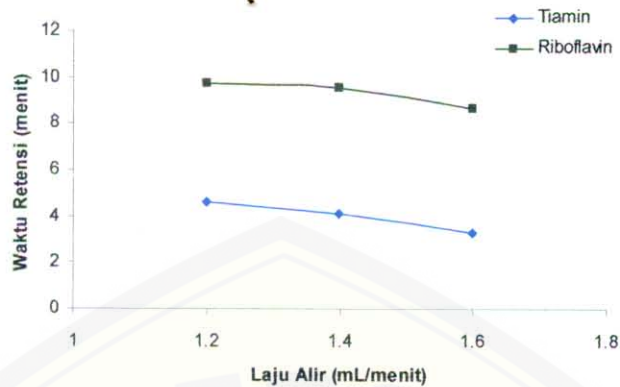


A.2 Tabel Data dan Efek Laju Alir (Flow Rate)

Laju Alir	Ulangan	Waktu Retensi		Absorbansi		Luas Puncak	
		Tiamin	Riboflavin	Tiamin	Riboflavin	Tiamin	Riboflavin
1,2	1	4,4	9,4	0,001	0,006	93,5	275
	2	4,8	9,8	0,001	0,005	77	264
	3	4,6	10	0,002	0,006	110,5	396
						93,67	311,67
1,4	1	4,2	9,8	0,002	0,007	100	333
	2	4,2	9,8	0,002	0,008	135	445
	3	4,0	9,0	0,003	0,008	132	425
						122,33	401,16
1,6	1	3,0	8,0	0,002	0,006	84	220,5
	2	3,4	8,6	0,002	0,006	88	238
	3	3,4	9,4	0,003	0,008	96	342
						89,3	266,83

Grafik Efek Laju Alir

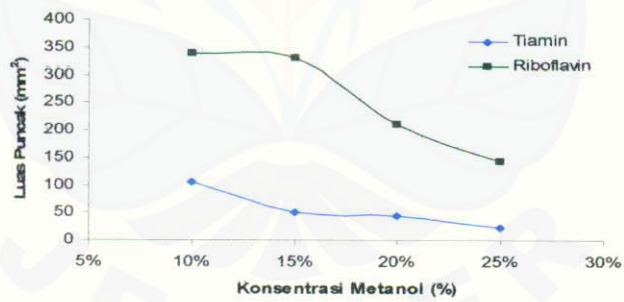
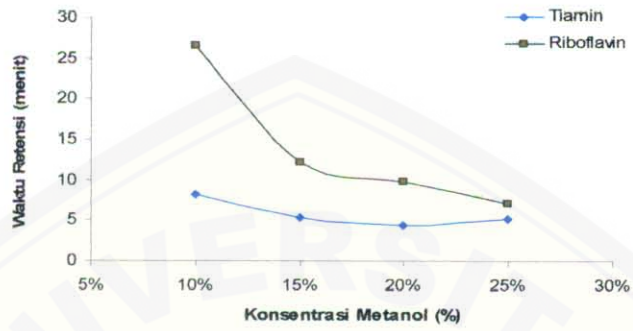




A.3 Tabel Data dan grafik Efek Komposisi Metanol

Komposisi metanol	Ulangan	Waktu Retensi		Absorbansi		Luas Puncak	
		Tiamin	Riboflavin	Tiamin	Riboflavin	Tiamin	Riboflavin
10%	1	8,2	26,4	0,001	0,004	84,5	320
	2	8,2	26,4	0,001	0,005	133	392
	3	8,2	26,6	0,001	0,004	97,5	306
						105	339,3
15%	1	5,4	12,4	0,001	0,003	55	320
	2	5,2	12,2	0,001	0,003	55	288
	3	5,6	12,0	0,001	0,003	40	390
						50	330
20%	1	4,8	10,0	0,001	0,004	38,5	220
	2	4,0	9,8	0,001	0,004	33	211,5
	3	4,4	9,6	0,001	0,004	60	200
						43,83	210,5
25%	1	5,0	7,0	0,001	0,003	21	172
	2	5,0	6,8	0,001	0,004	24	107,5
	3	5,8	7,6	0,001	0,004	27	150,5
						24	143,3

Grafik Efek Komposisi Metanol

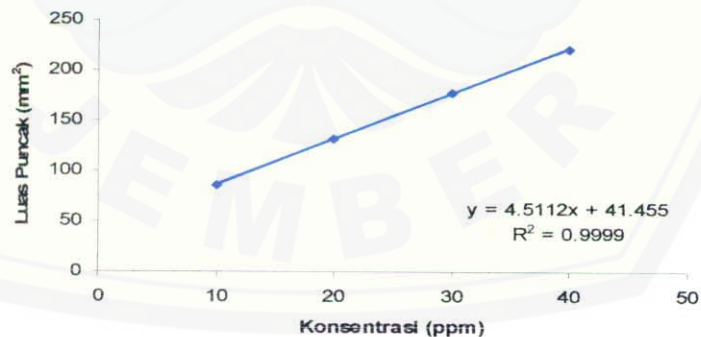


LAMPIRAN B. KURVA KALIBRASI LARUTAN STANDAR TIAMIN DAN RIBOFLAVIN

B.1 Tabel data dan grafik kurva kalibrasi larutan standar Tiamin

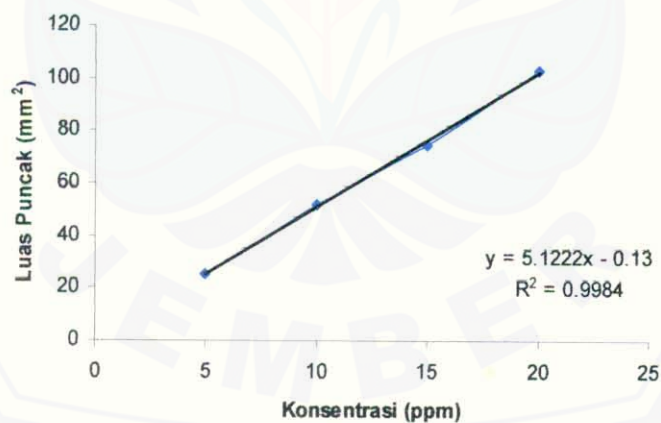
Konsentrasi	Ulangan	Waktu Retensi	Absorbansi	Luas Puncak
10 ppm	1	5,0	0,003	108
	2	5,0	0,003	80,5
	3	5,4	0,003	70
				86,17
20 ppm	1	5,0	0,004	135
	2	5,4	0,004	150,5
	3	5,8	0,004	111
				132,17
30 ppm	1	5,0	0,004	126
	2	5,2	0,005	147
	3	5,6	0,005	189
				177
40 ppm	1	5,0	0,007	199,5
	2	5,0	0,007	220,5
	3	6,0	0,008	245
				221,16

Grafik kurva kalibrasi larutan standar Tiamin



B.2 Tabel Data dan grafik Kurva Kalibrasi Larutan Standar Riboflavin

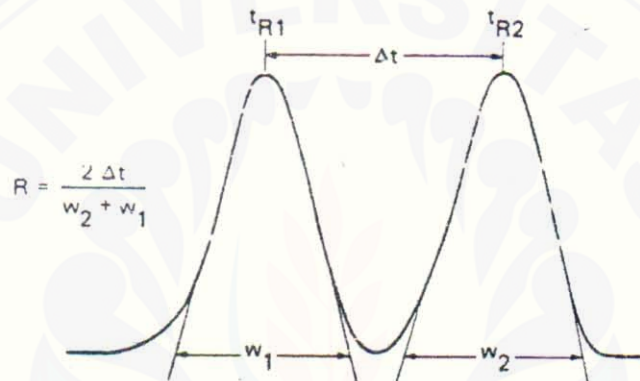
Konsentrasi	Ulangan	Waktu Retensi	Absorbansi	Luas Puncak
5 ppm	1	11,8	0,001	36
	2	12,2	0,001	28
	3	12,4	0,001	12,5
				25,5
10 ppm	1	11,8	0,002	135
	2	12,4	0,002	150,5
	3	12,6	0,002	111
				132,17
15 ppm	1	12,2	0,002	126
	2	12,4	0,002	147
	3	12,8	0,003	189
				177
20 ppm	1	12,2	0,004	199,5
	2	11,8	0,004	220,5
	3	12,6	0,004	245
				221,16

Grafik kurva kalibrasi larutan standar riboflavin

LAMPIRAN C. TABEL DATA PENGUKURAN SAMPEL

Ulangan	Waktu Retensi		Absorbansi		Luas Puncak	
	Tiamin	Riboflavin	Tiamin	Riboflavin	Tiamin	Riboflavin
1	5,4	12,4	0,005	0,001	197,5	40
2	5,2	12,6	0,005	0,001	195	37,5
3	5,6	12,6	0,007	0,001	170	40
Rata-rata	5,4	12,53	0,0056	0,001	187,5	39,16

C. 1 Resolusi (daya pisah)



Pengulangan 1

$$R_s = \frac{2(35)}{(9+5)}$$

$$R_s = \frac{70}{15}$$

$$R_s = 5$$

Pengulangan 2

$$R_s = \frac{2(36)}{(8+4)}$$

$$R_s = \frac{72}{12}$$

$$R_s = 6$$

Pengulangan 3

$$R_s = \frac{2(36)}{(7+5)}$$

$$R_s = \frac{72}{(12)}$$

$$R_s = 6$$

C.2 Limit Deteksi

1. Tiamin

x (ppm)	y	\hat{y}	$ y - \hat{y} $	$ y - \hat{y} ^2$
10	86,17	86,567	0,397	0,1576
20	132,17	131,679	0,491	0,2410
30	177	176,791	0,209	0,0436
40	221,6	221,903	0,303	0,0918
				$\sum y - \hat{y} ^2 = 0,5341$

\hat{y} diperoleh dengan memasukkan harga x pada persamaan regresi:

$$y = 4,5112x + 41,455$$

$$S_B = \frac{S_y}{x} = \left\{ \frac{\sum |y - \hat{y}|^2}{n-2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad S_B = \frac{S_y}{x} = \left\{ \frac{0,5341}{3-2} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$S_B = 0,7308$$

$$Y_{LOD} = Y_B - 3S_B$$

Y_B adalah intersep pada persamaan regresi kurva kalibrasi.

$$Y_{LOD} = 41,455 - 3(0,7308)$$

$$Y_{LOD} = 39,2623$$

$$\text{Limit Deteksi}(X_{LOD}) = \frac{c - Y_{LOD}}{m}$$

$$\text{Limit Deteksi}(X_{LOD}) = \frac{41,455 - 39,2623}{4,5112}$$

$$\text{Limit Deteksi}(X_{LOD}) = 0,48$$

2. Riboflavin

x (ppm)	y	\hat{y}	$ y - \hat{y} $	$ y - \hat{y} ^2$
5	25,5	25,481	0,019	0,0003
10	52	51,092	0,908	0,8244
15	74,83	76,703	1,873	3,5081
20	103,26	102,314	0,946	0,8949
				$\sum y - \hat{y} ^2 = 5,2278$

\hat{y} diperoleh dengan memasukkan harga x pada persamaan regresi:

$$y = 5,1222x - 0,13$$

$$S_B = \frac{S_y}{x} = \left\{ \frac{\sum |y - \hat{y}|^2}{n - 2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad S_B = \frac{S_y}{x} = \left\{ \frac{5,2278}{3 - 2} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$S_B = 2,2864$$

$$Y_{LOD} = Y_B - 3S_B$$

Y_B adalah intersep pada persamaan regresi kurva kalibrasi.

$$Y_{LOD} = 0,13 - 3(2,2864)$$

$$Y_{LOD} = -6,7293$$

$$\text{Limit Deteksi}(X_{LOD}) = \frac{c - Y_{LOD}}{m}$$

$$\text{Limit Deteksi}(X_{LOD}) = \frac{0,13 - (-6,7293)}{5,1222}$$

$$\text{Limit Deteksi}(X_{LOD}) = 1,33$$

LAMPIRAN D. PERHITUNGAN KADAR TIAMIN DAN RIBOFLAVIN DALAM SAMPEL**D.1 Kadar tiamin dalam Sampel**

Persamaan kurva kalibrasi tiamin adalah :

$$y = 4,5112x + 41,455$$

Luas puncak tiamin = 187,5

$$4,5112x = 187,5 - 41,455$$

$$x = \frac{146,045}{4,5112}$$

$$x = 32,37 \text{ ppm}$$

Kadar tiamin = Konsentrasi (ppm) x 0,05 L

Kadar tiamin = 32,37 x 0,05 L

Kadar tiamin = 1,61 mg

D.2 Kadar Riboflavin dalam sampel

Persamaan kurva kalibrasi tiamin adalah :

$$y = 5,1222x - 0,13$$

Luas Puncak Riboflavin = 39,16

$$5,1222x = 39,16 - 0,13$$

$$x = \frac{39,03}{5,1222}$$

$$x = 7,619 \text{ ppm}$$

Kadar tiamin = Konsentrasi (ppm) x 0,05 L

Kadar tiamin = 7,61 ppm x 0,05 L

Kadar tiamin = 0,38 mg

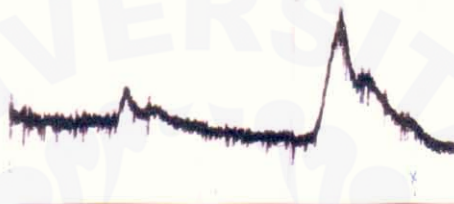
LAMPIRAN E. KROMATOGRAM OPTIMASI PEMISAHAN TIAMIN DAN RIBOFLAVIN

E.1 Efek Larutan Buffer

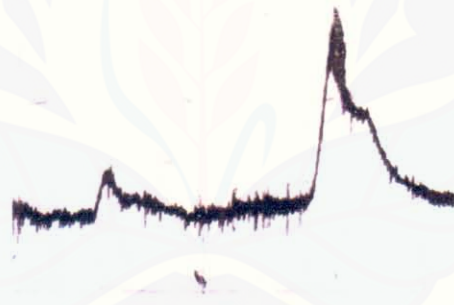
E.1.1 Buffer pH 7

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,2 mL/ menit, konsentrasi metanol 20 %, konsentrasi tiamin 20 ppm, riboflavin 80 ppm.

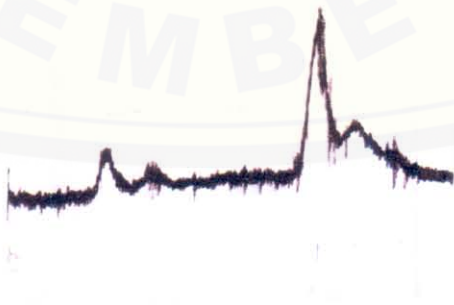
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 5,4 menit, riboflavin 15,2 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 4,8 menit, riboflavin 15,2 menit)



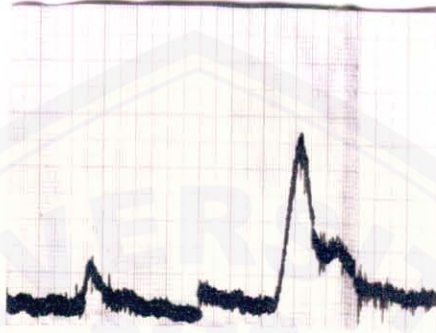
Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 4,8 menit, riboflavin 15 menit)



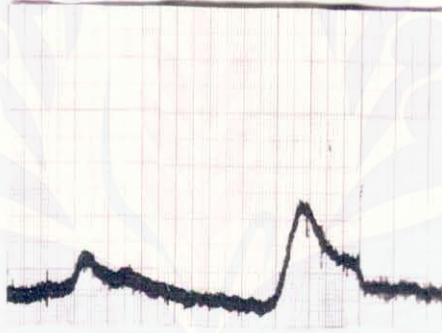
E.1.2 Buffer pH 6

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,2 mL/ menit, konsentrasi metanol 20 %, konsentrasi tiamin 20 ppm, riboflavin 80 ppm.

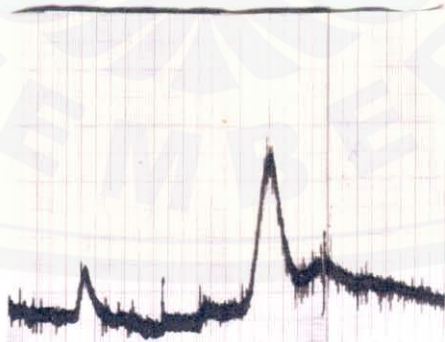
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 5,2 menit, riboflavin 18,6 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 4,8 menit, riboflavin 19,2 menit)



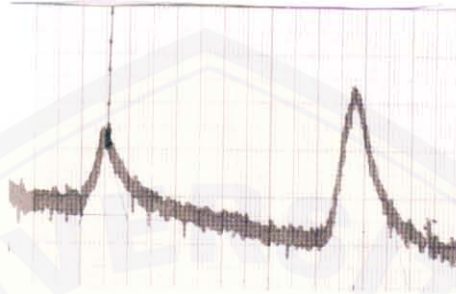
Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 5,2 menit, riboflavin 18,2 menit)



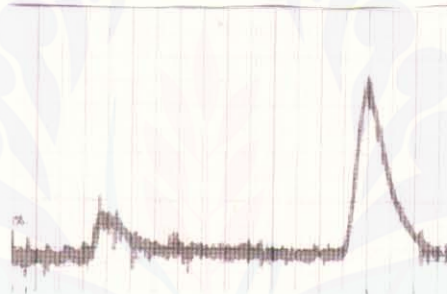
E.1.3 Buffer pH 5

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,2 mL/ menit, konsentrasi metanol 20 %, konsentrasi tiamin 20 ppm, riboflavin 80 ppm.

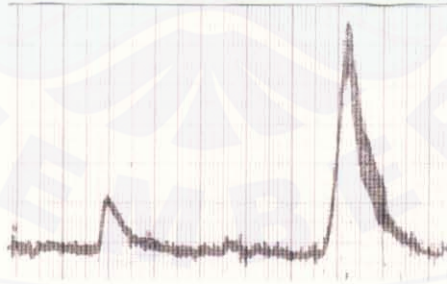
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 4,0 menit, riboflavin 14,6 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 4,0 menit, riboflavin 15,0 menit)



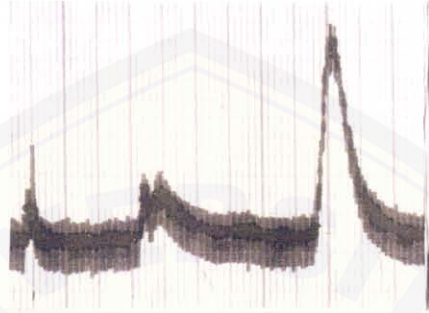
Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 4,0 menit, riboflavin 14,6 menit)



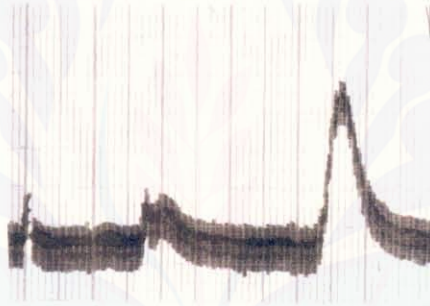
E.1.4 Buffer pH 4

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,2 mL/ menit, konsentrasi metanol 20 %, konsentrasi tiamin 20 ppm, riboflavin 80 ppm.

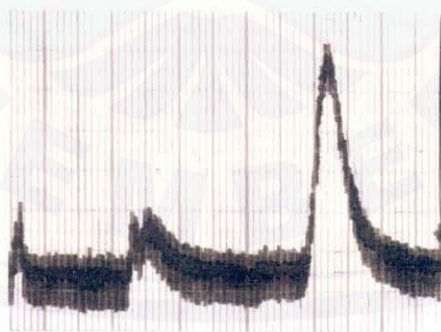
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 4,2 menit, riboflavin 9,8 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 4,0 menit, riboflavin 9,4 menit)



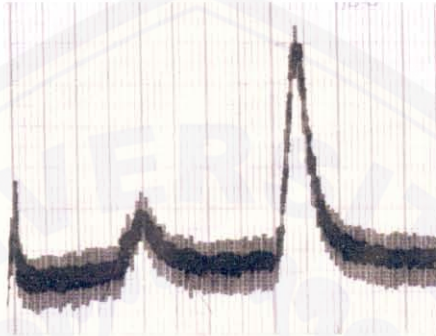
Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 4,2 menit, riboflavin 9,8 menit)



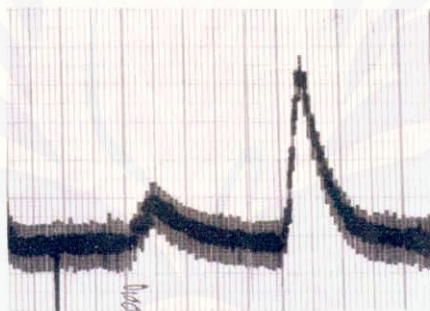
E.2 Efek laju alir**E.2.1 Laju Alir 1,2**

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,2 mL/ menit, konsentrasi metanol 20 %, buffer K_2HPO_4 0,005 M pH 4 konsentrasi tiamin 20 ppm, riboflavin 80 ppm.

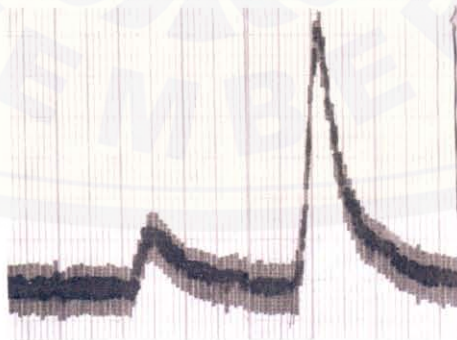
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 4,4 menit, riboflavin 9,8 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 4,8 menit, riboflavin 9,8 menit)



Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 4,6 menit, riboflavin 10,0 menit)



E.2.2 Laju Alir 1,4

Sensitivitas Rekorder 1 mv/cm, Paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,4 mL/ menit, konsentrasi metanol 20 %, buffer K_2HPO_4 0,005 M pH 4 konsentrasi tiamin 20 ppm, riboflavin 80 ppm.

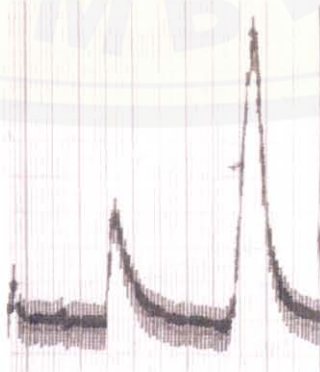
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 4,2 menit, riboflavin 9,8 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 4,2 menit, riboflavin 9,8 menit)



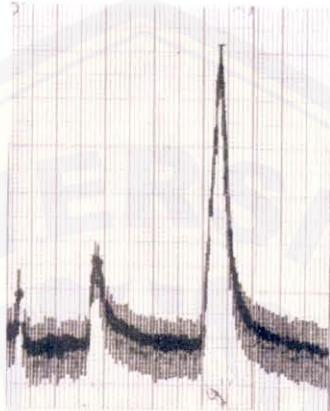
Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 4,0 menit, riboflavin 9,0 menit)



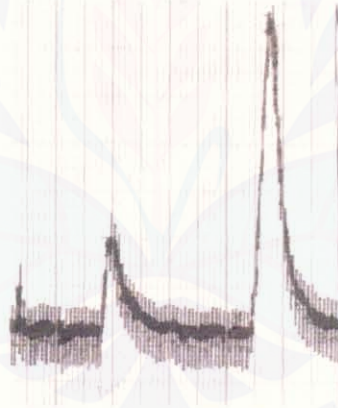
E.2.3 Laju alir 1,6

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,6 mL/ menit, konsentrasi metanol 20 %, buffer K_2HPO_4 0.005 M pH 4 konsentrasi tiamin 20 ppm, riboflavin 80 ppm.

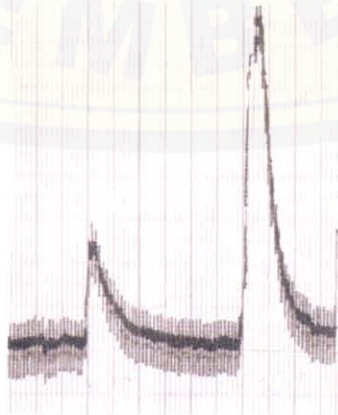
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 3,0 menit, riboflavin 8,0 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 3,4 menit, riboflavin 8,6 menit)



Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 3,4 menit, riboflavin 9,4 menit)

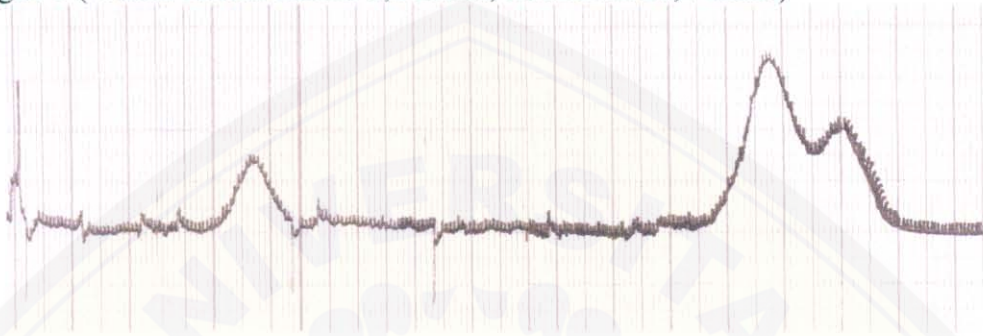


E.3 Efek Komposisi Eluen

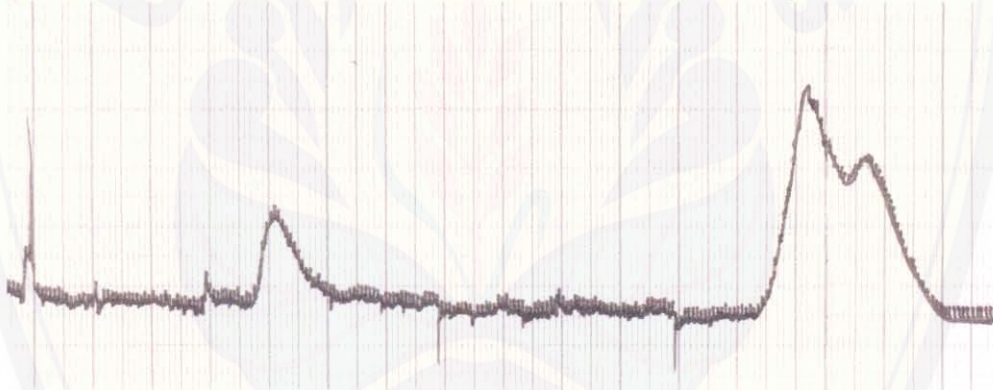
E.3.1 Konsentrasi Metanol 10 %

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,4 mL/ menit, konsentrasi metanol 15 %, buffer K_2HPO_4 0.005 M pH 4 konsentrasi tiamin 20 ppm, riboflavin 80 ppm.

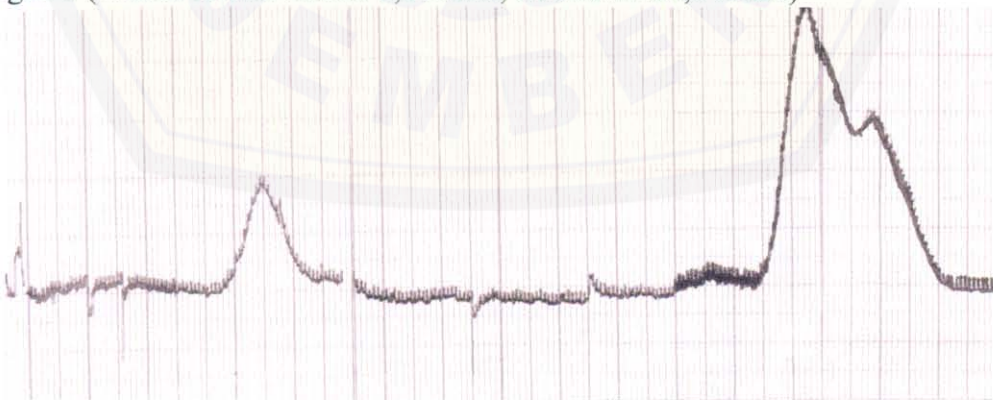
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 8,2 menit, riboflavin 26,4 menit)



Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 8,2 menit, riboflavin 26,4 menit)



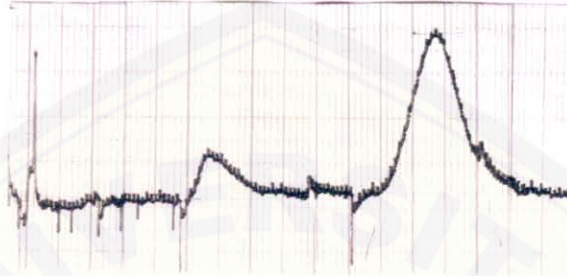
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 8,2 menit, riboflavin 26,6 menit)



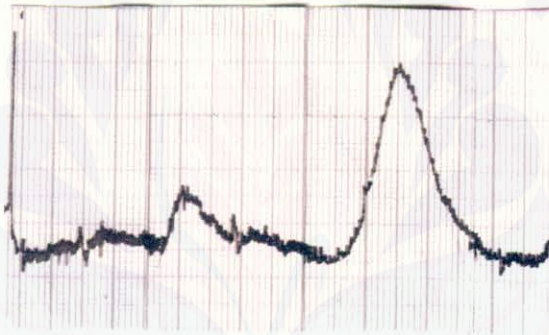
E.3.2 Konsentrasi Metanol 10 %

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,4 mL/ menit, konsentrasi metanol 15 %, buffer K_2HPO_4 0,005 M pH 4 konsentrasi tiamin 20 ppm, riboflavin 80 ppm.

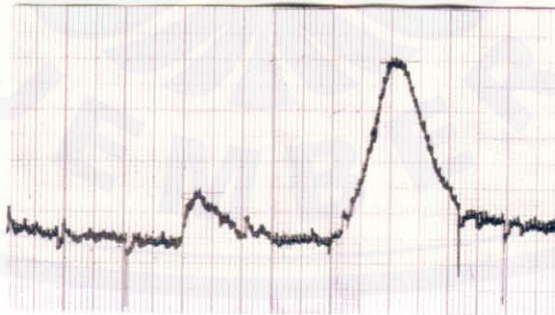
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 5,4 menit, riboflavin 12,4 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 5,2 menit, riboflavin 12,2 menit)



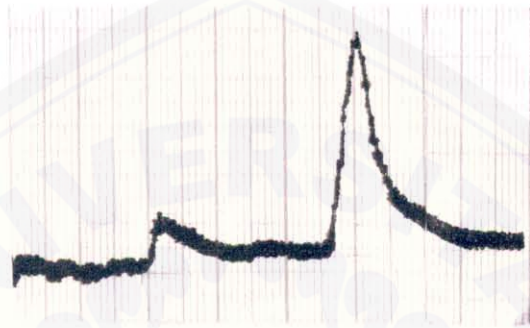
Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 5,6 menit, riboflavin 12,0 menit)



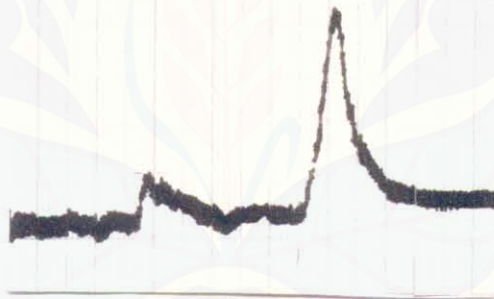
E.3.3 Konsentrasi Metanol 20%

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,4 mL/ menit, konsentrasi metanol 20 %, buffer K_2HPO_4 0,005 M pH 4 konsentrasi tiamin 20 ppm, riboflavin 80 ppm.

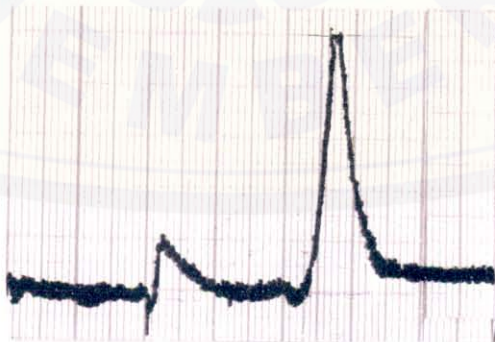
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 4,8 menit, riboflavin 10 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 4,0 menit, riboflavin 9,8 menit)



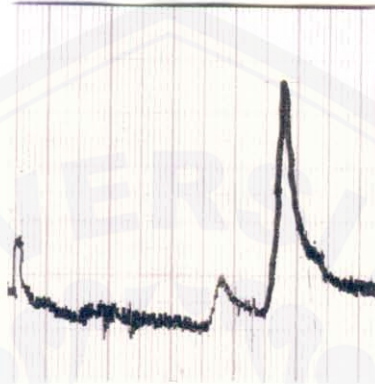
Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 4,4 menit, riboflavin 9,6 menit)



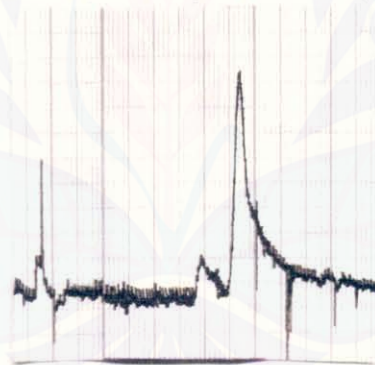
E.3.4 Konsentrasi Metanol 25 %

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,4 mL/ menit, konsentrasi metanol 25 %, buffer K_2HPO_4 0,005 M pH 4 konsentrasi tiamin 20 ppm, riboflavin 80 ppm.

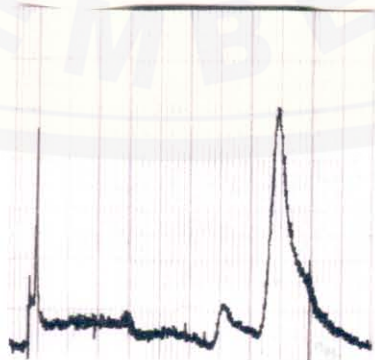
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 5,0 menit, riboflavin 7 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 5,0 menit, riboflavin 6,8 menit)



Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 6,8 menit, riboflavin 7,6 menit)

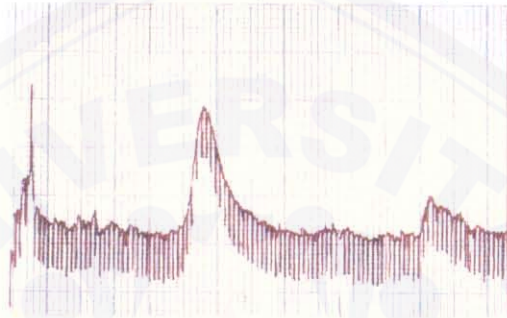


LAMPIRAN F. KROMATOGRAM KURVA KALIBRASI LARUTAN STANDAR TIAMIN DAN RIBOFLAVIN

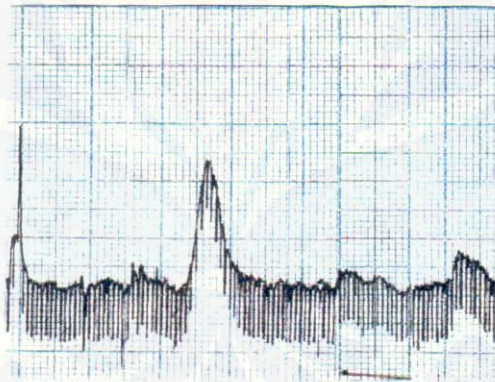
F.1 Konsentrasi tiamin 10 ppm dan riboflavin 5 ppm

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,4 mL/ menit, konsentrasi metanol 15 %, buffer K_2HPO_4 0,005 M pH 4

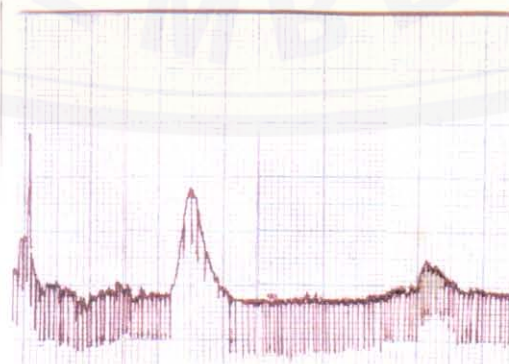
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 5,0 menit, riboflavin 11,8 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 5,0 menit, riboflavin 12,2 menit)



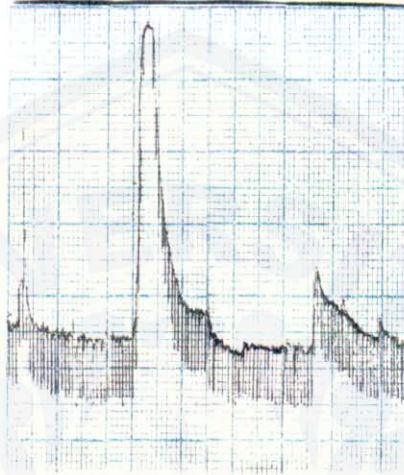
Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 5,4 menit, riboflavin 12,4 menit)



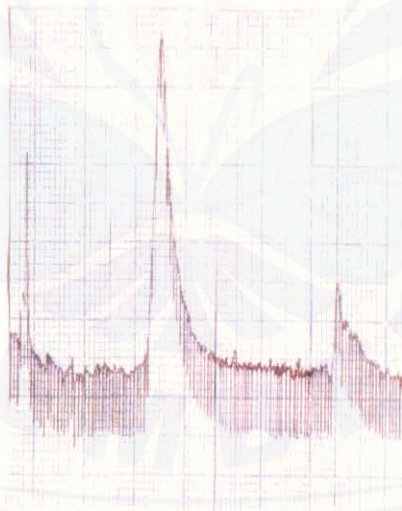
F.2 Konsentrasi Tiamin 20 ppm dan Riboflavin 10 ppm

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,4 mL/ menit, konsentrasi metanol 15 %, buffer K_2HPO_4 0,005 M pH 4.

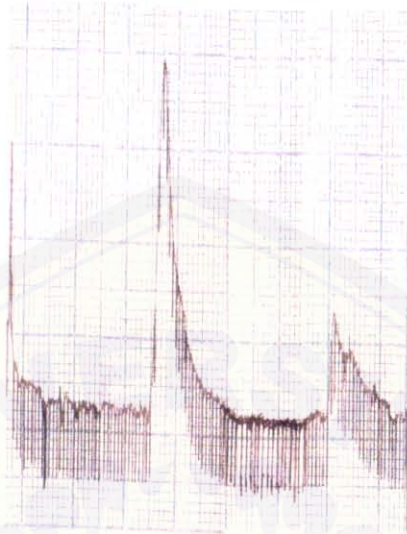
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 5,0 menit, riboflavin 11,8 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 5,4 menit, riboflavin 12,4 menit)



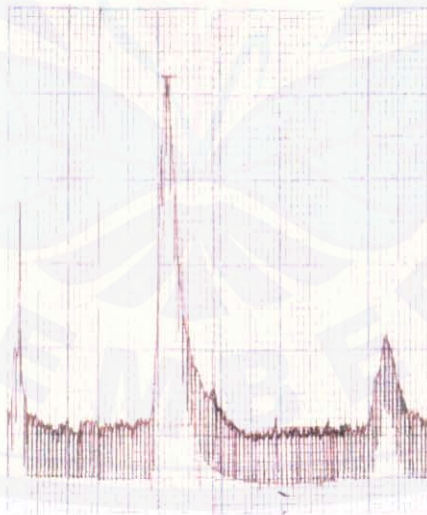
Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 5,8 menit, riboflavin 12,6 menit)



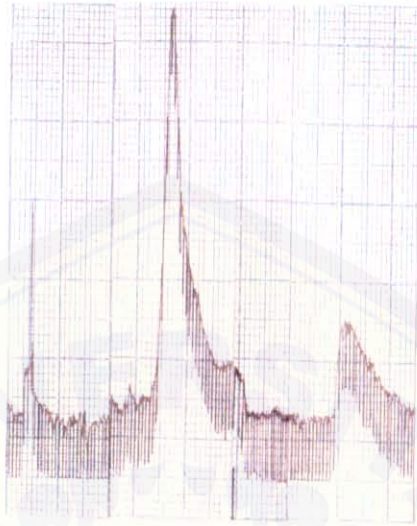
F.3 Konsentrasi Tiamin 30 ppm dan Riboflavin 15 ppm

Sensitivitas rekorder 1 Mv/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,4 mL/ menit, konsentrasi metanol 15 %, buffer K_2HPO_4 0,005 M pH 4

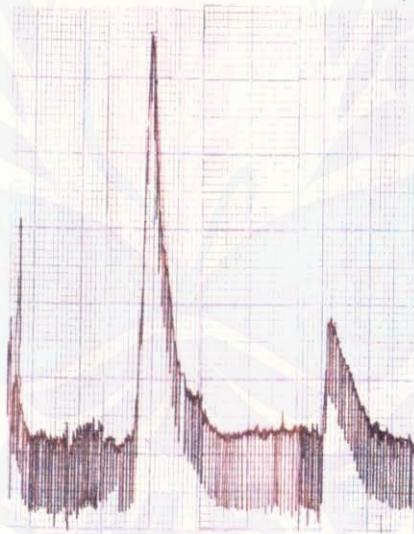
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 5,0 menit, riboflavin 12,2 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 5,2 menit, riboflavin 12,4 menit)



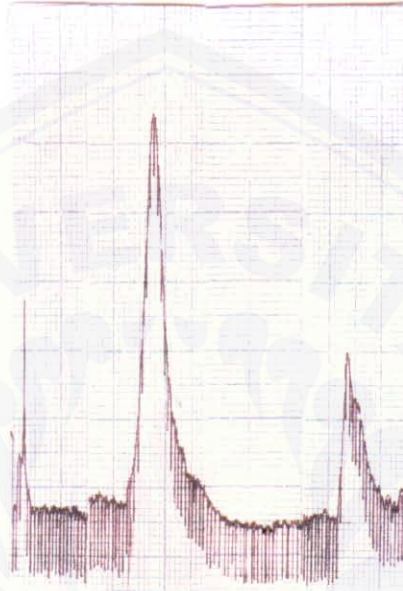
Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 5,6 menit, riboflavin 12,8 menit)



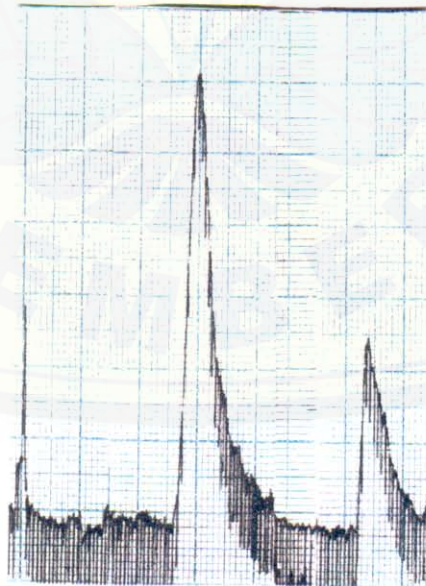
F.4 Konsentrasi Tiamin 40 ppm dan Riboflavin 20 ppm

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,4 mL/ menit, konsentrasi metanol 15 %, buffer K_2HPO_4 0,005 M pH 4.

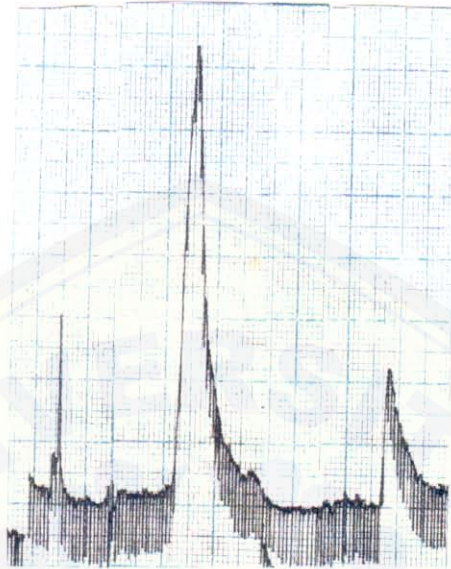
Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 5,0 menit, riboflavin 12,2 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 5,0 menit, riboflavin 11,8 menit)



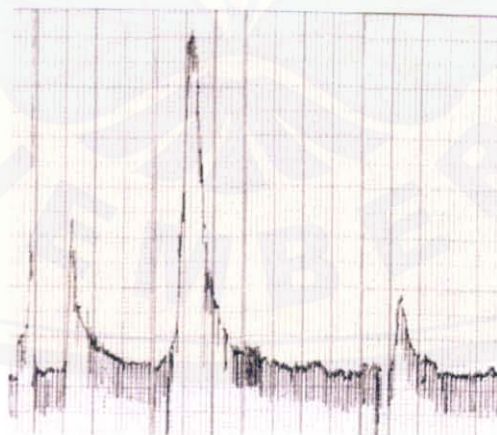
Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 6,0 menit, riboflavin 12,6 menit)



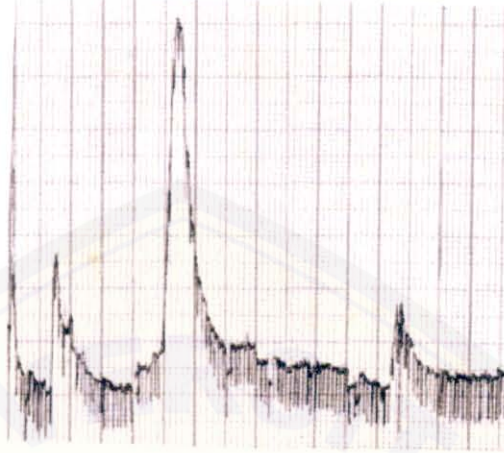
LAMPIRAN G. KROMATOGRAM SAMPEL

Sensitivitas rekorder 1 mV/cm, paper speed 5 mm/menit, flow rate 1,4 mL/ menit, konsentrasi metanol 15 %, buffer K_2HPO_4 0,005 M pH 4.

Ulangan 1 (Waktu retensi tiamin 5,4 menit, riboflavin 12,4 menit)



Ulangan 2 (Waktu retensi tiamin 5,2 menit, riboflavin 12,6 menit)



Ulangan 3 (Waktu retensi tiamin 5,6 menit, riboflavin 12,6 menit)

