

-11/07/04

IR - Perpustakaan Universitas Airlangga

kk

TF.01/05

- P. SE

TESIS

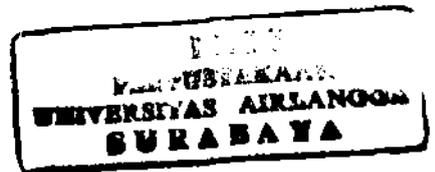
Hari

✓

**VALIDASI METODE
UNTUK PENETAPAN KADAR VITAMIN B₃
DALAM BERAS DAN AIR CUCIANNYA DENGAN
KROMATOGRafi GAS RESOLUSI TINGGI**



Dedi Hanwar

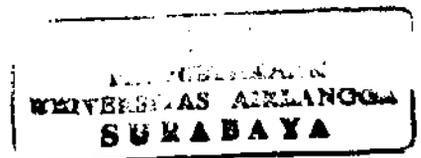


**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

TESIS

**VALIDASI METODE
UNTUK PENETAPAN KADAR VITAMIN B₃
DALAM BERAS DAN AIR CUCIANNYA DENGAN
KROMATOGRAFI GAS RESOLUSI TINGGI**

**Dedi Hanwar
090214707 M**



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

**VALIDASI METODE
UNTUK PENETAPAN KADAR VITAMIN B₃
DALAM BERAS DAN AIR CUCIANNYA DENGAN
KROMATOGRAFI GAS RESOLUSI TINGGI**

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Farmasi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh:
**Dedi Hanwar
090214707 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Tanggal 19 Agustus 2004**

Lembar pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 11 AGUSTUS 2004**

Oleh

Pembimbing Ketua



**Prof. Dr. H. Muhammad Mulja
NIP. 130 675 596**

Pembimbing



**Dr. rer.nat. H. Mochammad Yuwono, MS
NIP. 131 569 384**

**Telah diuji pada
Tanggal 19 Agustus 2004
PANITIA PENGUJI TESIS**

Ketua : Prof. Dr. H. Amirudin Prawita

Anggota : 1. Prof. Dr. H. Muhammad Mulja

2. Prof. Dr. H. Achmad Syahrani, MS

3. Prof. Dr. H. Purwanto

4. Dr. rer.nat. H. Mochammad Yuwono, MS

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmad dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga saya haturkan kepada Prof. Dr. H. Muhammad Mulja, Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran dalam menyelesaikan tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya saya haturkan kepada Dr. rer.nat. H. Mochammad Yuwono, MS, Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran dalam menyelesaikan tesis ini.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Rektor dan Pembantu Rektor I Universitas Muhammadiyah Surakarta yang telah memberikan ijin, kesempatan, dan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Penelitian dan tesis ini dapat diselesaikan dengan adanya bantuan serta dukungan dari berbagai pihak dalam berbagai bentuk, oleh karena itu perkenankanlah saya mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada:

- Rektor Universitas Airlangga dan Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister ini.
- Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini dan Ketua Program Studi Ilmu Farmasi, Dr. Djoko Agus Purwanto,

MS, atas kesempatan dan bantuan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister ini

- Dekan Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta Dr. H. Kuswandi, M.Phil, yang dengan penuh pengertian memberikan izin dan kesempatan untuk menyelesaikan program Magister saya
- Seluruh dosen yang mendidik dan membagi ilmunya kepada saya selama mengikuti pendidikan di program Magister ini.
- Istriku tercinta, yang dengan doa, cinta, kesabaran dan pengertiannya memberikan dorongan dan semangat kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan program Magister ini
- Orang tua, mertua, kakak, dan adik-adik, yang selalu berdoa dan memberikan semangat dalam menyelesaikan studi ini.
- Rekan-rekan sesama kuliah di program Pascasarjana Universitas Airlangga dan rekan-rekan sesama pengajar di Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, serta semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah banyak memberikan bantuan dan dukungan berupa moril maupun materil untuk menyelesaikan penelitian dan tesis saya ini.

Semoga hasil penelitian dan tesis yang masih jauh dari sempurna ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Surabaya, Agustus 2004

Penulis

RINGKASAN

Validasi Metode Untuk Penetapan Kadar Vitamin B₃ Dalam Beras dan Air Cuciannya dengan Kromatografi Gas Resolusi Tinggi

Dedi Hanwar

Air cucian beras secara tradisional digunakan oleh sebagian masyarakat sebagai penghalus dan pelembut kulit. Efek menghaluskan dan melembutkan kulit dari air cucian beras ini mungkin disebabkan oleh adanya vitamin B₃ yang terekstraksi dari beras ke dalam air. Selain itu, berkurangnya kandungan vitamin B₃ dalam beras akibat terekstraksinya vitamin ini sewaktu proses pencucian beras mengakibatkan berkurangnya pula jumlah vitamin B₃ yang dikonsumsi, oleh karena itu telah dilakukan penelitian untuk menetapkan kadar vitamin B₃ dalam beras dan air cuciannya dengan menggunakan metode kromatografi gas.

Proses penetapan kadar vitamin B₃ dalam beras dan air cuciannya dibagi dalam empat tahapan utama yaitu optimasi, uji kualitatif vitamin B₃ dalam sampel, validasi, dan pengukuran kadar vitamin B₃ dalam sampel. Optimasi yang dilakukan ada dua, yaitu optimasi metode dan optimasi pelarut pengekstraksi. Validasi meliputi selektifitas, limit deteksi dan limit kuantitasi, linieritas, akurasi dan presisi.

Kondisi optimum kromatografi gas untuk penetapan kadar vitamin B₃ dalam sampel dicapai dengan mengatur kecepatan alir gas pembawa 1,0 mL/menit, suhu inlet 280°C, suhu detektor 300°C dan suhu oven terprogram dengan suhu awal 110°C selama 1,5 menit dengan kenaikan suhu 8 °C/menit

hingga mencapai suhu 176 °C yang dipertahankan selama 2 menit dan dinaikkan lagi dengan kenaikan 20 °C hingga mencapai suhu akhir 250 °C.

Pelarut terpilih yang digunakan untuk mengekstraksi vitamin B₃ dari sampel adalah etil asetat. Uji kualitatif dengan cara adisi menunjukkan adanya vitamin B₃ di dalam sampel, dan dipertegas dengan hasil spektrum massa analit sampel yang sama dengan spektrum massa vitamin B₃ pada pustaka.

Uji validasi yang dilakukan memenuhi persyaratan validasi yaitu untuk uji selektifitas diperoleh harga $R_s > 1$, untuk uji sensitifitas diperoleh nilai limit deteksinya adalah 0,002746 mg/mL dan limit kuantitasnya adalah 0,009153 mg/mL, kurva kalibrasinya linier dengan persamaan garis regresi $y = 996,21692x + 1,03194$ dengan $r = 0,99994$ dan $V_{xo} < 2\%$. Hasil pengukuran akurasi menunjukkan harga persen recovery 88,42% dan presisi metode diperoleh KV sebesar 6,92%.

Pengambilan sampel beras putih dan beras merah dilakukan di daerah Delanggu secara random sampling. Setelah sampel dipreparasi sesuai dengan prosedur preparasi sampel maka larutan sampel disuntikkan ke dalam kromatograf gas. Hasil pengukuran kadar vitamin B₃ dalam beras didapatkan kadar vitamin B₃ pada beras merah (0,00351 % b/b) lebih besar daripada beras putih (0,00185 % b/b) dan dengan tiga kali pencucian beras putih maka kadar vitamin B₃ telah terekstraksi dari beras sebesar 85,41%, sedangkan pada beras merah dengan tiga kali pencucian maka vitamin B₃ terekstraksi sebesar 85,75%.

SUMMARY

Method Validation for Determination of Vitamin B₃ in Rice and Its Washing Water by High Resolution Gas Chromatography

Dedi Hanwar

Washing water of rice is traditionally used by some of people to get smoother and softer skin. Perhaps, smoothing and softening effect from this washing water to skin is caused by the presence of vitamin B₃ which is extracted by the water from rice. Beside of that, the decreasing of vitamin B₃ content from the rice because of extraction of this vitamin during washing process also decreases quantity of vitamin B₃ which is used for consumption, then a research have been conducted to determine the presence of vitamin B₃ in rice and its washing water by high resolution gas chromatography.

The processes which were conducted to determine the presence of vitamin B₃ in rice and its washing water were divided into four main phases that was optimization, qualitative test of vitamin B₃ in the sample, validation, and determination of vitamin B₃ in the sample. Optimization which was conducted consists of two ways, that was method and extractor solvent optimization. Validation includes selectivity, detection and quantitation limit, linearity, accuracy and precision.

Optimum condition of gas chromatography to determine the presence of vitamin B₃ in the sample was used with the carrier gas flow rate at 1.0 mL/min, the temperature of inlet and detector were set at 280°C and 300°C and the oven

temperature was programmed to initiate at 110°C and held for 1.5 minutes, the temperature was raised to 176°C at a rate of 8 °C/min and held for 2 minutes and finally increase to 250 °C at a rate of 20°C/min.

The chosen solvent to extract vitamin B₃ from the sample was ethyl acetate. Qualitative test by using addition showed the presence of vitamin B₃ in the sample, and it is assured by the result of mass spectrum of vitamin B₃ in the sample which was same with mass spectrum of vitamin B₃ in library.

Validation test which was performed fulfills validation regulation, that selectivity test was obtained $R_s > 1$, detection limit for vitamin B₃ was 0.002746 mg/mL and quantitation limit was 0.009153 mg/mL, the calibration curve was linear with the regression line $y = 996.21692x + 1.03194$ and the coefficient r was 0.99994 and $V_{xo} < 2\%$. The percent recovery was 88.42% and the precision was good with coefficient of variation of 6.92%.

The sample (i.e., white and red rice) was obtained in Delanggu by random sampling method. After the sample has been prepared according to sample preparation procedure then the sample solution was injected into gas chromatography. The vitamin B₃ content in the the red rice (0.00351 % b/b) was higher than the white one (0.00185 % b/b) and within three times washing of the white rice then its vitamin B₃ content has been extracted from the rice 85.41%, while for the red rice within three times washing then its vitamin B₃ content was extracted 85.75%.

ABSTRACT**Method Validation for Determination of Vitamin B₃
in Rice and Its Washing Water by High Resolution Gas Chromatography**

Dedi Hanwar

Determination of vitamin B₃ in rice and its washing water by high resolution gas chromatography has been developed and validated. For this study, a gas chromatography equipped with a flame ionization detector (FID) and a column HP-5 (5% Phenyl Methyl Siloxane, 30 m x 0.32 mm, 0.25 µm) was used with the carrier gas flow rate at 1.0 mL/min, the temperature of inlet and detector were set at 280°C and 300°C and the oven temperature was programmed to initiate at 110°C and held for 1.5 minutes, the temperature was raised to 176°C at a rate of 8°C/min and held for 2 minutes and finally increase to 250°C at a rate of 20°C/min. The sample was extracted with ethyl acetate and the sample solution was injected into gas chromatography. Qualitative analysis by GC-MSD was showed the presence of vitamin B₃ in the sample. Validation test found that the detection limit for vitamin B₃ was 0.002746 mg/mL and quantitation limit was 0.009153 mg/mL, the calibration curve was linear with the regression line $y = 996.21692x + 1.03194$ and the coefficient r was 0.99994 and $V_{xo} < 2\%$. The percent recovery was 88.42% and the precision was good with coefficient of variation of 6.92%. The sample (i.e., white and red rice) were analyzed with this method. The vitamin B₃ content in the the red rice (0.00351 % b/b) was higher than the white one (0.00185 % b/b) and within three times washing of the white

rice then its vitamin B₃ content has been extracted from the rice 85.41%, while for the red rice within three times washing then its vitamin B₃ content was extracted 85.75%.

Keywords: Vitamin B₃, gas chromatography, rice, validation

DAFTAR ISI

	Hal
Sampul Dalam	i
Prasyarat Gelar	ii
Persetujuan	iii
Penetapan Panitia	iv
Ucapan Terima Kasih	v
Ringkasan	vii
Summary	ix
Abstract	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	7
1.3. Tujuan Penelitian.....	7
1.4. Manfaat Penelitian.....	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. Tinjauan Tentang Beras	9
2.1.1. Tinjauan Umum Tentang Beras	9
2.1.2. Kandungan Nutrisi Beras	10
2.2. Tinjauan Tentang Vitamin B ₃	11
2.2.1. Tinjauan Umum	11
2.2.2. Sifat Fisika Kimia Vitamin B ₃	13
2.2.3. Metode Penetapan Kadar Vitamin B ₃	14
2.3. Tinjauan Tentang Ekstraksi	17
2.4. Tinjauan Tentang Kromatografi Gas	18
2.4.1. Tinjauan Umum	18
2.4.2. Tinjauan Tentang Instrumen Kromatografi Gas	20
2.4.2.1. Gas	20
2.4.2.2. Pemasukan Sampel	22
2.4.2.3. Sistem Inlet	23
2.4.2.4. Oven	24
2.4.2.5. Kolom	24
2.4.2.6. Detektor	25
2.4.3. Parameter Kromatografi	26
2.4.3.1. Waktu Tambat (t_R)	26
2.4.3.2. Faktor Selektifitas (α)	26
2.4.3.3. Derajat Keterpisahan atau Resolusi (R_s)	27
2.4.4. Analisis Kualitatif dan Kuantitatif dengan Kromatografi Gas ..	27
2.5. Tinjauan Tentang Validasi Metode	29
2.5.1. Akurasi	29
2.5.2. Presisi	30
2.5.3. Selektifitas	30

	Hal
2.5.4. Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi	30
2.5.5. Linieritas	31
2.5.6. Ruggedness dan Robustness	31
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN	32
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	32
3.2. Bagan Kerangka Konseptual	33
BAB IV. METODE PENELITIAN	34
4.1. Jenis Penelitian	34
4.2. Lokasi dan Waktu Penelitian	34
4.3. Bahan Penelitian	34
4.4. Instrumen Penelitian	34
4.5. Rancangan Penelitian	35
4.6. Tahap Penelitian	36
4.6.1. Optimasi Kondisi Kromatografi Gas	36
4.6.2. Optimasi Ekstraksi	36
4.6.2.1. Pemilihan Pelarut Pengekstraksi	36
4.6.2.2. Penentuan Pengulangan Ekstraksi yang Optimum untuk Menarik Vitamin B ₃ dari Larutan	37
4.6.3. Uji Kualitatif Vitamin B ₃ dalam Sampel	37
4.6.3.1. Perbandingan Waktu Tambat Analit dalam Sampel dengan Standar Vitamin B ₃	37
4.6.3.2. Metode Adisi Standar Vitamin B ₃ terhadap Sampel	38
4.6.3.3. Uji Kualitatif Vitamin B ₃ dengan GC-MSD	38
4.6.4. Validasi Metode	38
4.6.4.1. Selektifitas	38
4.6.4.2. Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi	39
4.6.4.3. Linieritas	39
4.6.4.4. Akurasi	40
4.6.4.5. Presisi	41
4.6.4.5.1. Presisi Alat	41
4.6.4.5.2. Presisi Metode	41
4.6.5. Pengambilan Sampel	41
4.6.6. Preparasi Sampel	41
4.6.7. Penetapan Kadar Vitamin B ₃ pada Beras	42
4.6.8. Penetapan Kadar Vitamin B ₃ pada Air Cucian Beras	42
BAB V. HASIL PENELITIAN	43
5.1. Optimasi Kondisi Kromatografi Gas	43
5.2. Optimasi Ekstraksi	44
5.2.1. Pemilihan Pelarut Pengekstraksi	44
5.2.2. Penentuan Pengulangan Ekstraksi yang Optimum untuk Menarik Vitamin B ₃ dari Larutan	45
5.3. Uji Kualitatif Vitamin B ₃ dalam Sampel	47
5.3.1. Perbandingan Waktu Tambat Analit dalam Sampel dengan Standar Vitamin B ₃	47
5.3.2. Metode Adisi Standar Vitamin B ₃ terhadap Sampel	47
5.3.3. Uji Kualitatif Vitamin B ₃ dengan GC-MSD	48

	Hal
5.4. Validasi Metode	49
5.4.1. Selektifitas	49
5.4.2. Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi	50
5.4.3. Linieritas	52
5.4.4. Akurasi	53
5.4.5. Presisi	54
5.4.5.1. Presisi Alat	54
5.4.5.2. Presisi Metode	55
5.5. Analisis Kuantitatif Vitamin B ₃ dalam Sampel	55
5.5.1. Penetapan Kadar Vitamin B ₃ dalam Beras.....	55
5.5.2. Penetapan Kadar Vitamin B ₃ dalam Air Cucian Beras	56
BAB VI. PEMBAHASAN	59
BAB VII. PENUTUP	66
7.1. Kesimpulan	66
7.2. Saran	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN	71

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 2.1. Kandungan nutrisi beras	11
Tabel 2.2. Fase diam yang banyak digunakan.....	24
Tabel 5.1. Hasil optimasi kondisi kromatografi gas	43
Tabel 5.2. Area vitamin B ₃ yang terdeteksi setelah ekstraksi dengan kloroform dan etil asetat	44
Tabel 5.3. Kadar vitamin B ₃ yang terekstraksi dari larutan vitamin B ₃ 1,0 mg/mL dalam air pada ekstraksi ke-n	45
Tabel 5.4. Kadar vitamin B ₃ yang terekstraksi pada n x ekstraksi terhadap larutan vitamin B ₃ 1,0 mg/mL	46
Tabel 5.5. Data penambahan area vitamin B ₃ sampel dengan penambahan larutan vitamin B ₃ standar	48
Tabel 5.6. Kadar dan tinggi puncak pada penentuan limit deteksi dan limit kuantitasi	52
Tabel 5.7. Hubungan antara kadar vitamin B ₃ dengan area vitamin B ₃	52
Tabel 5.8. Persen perolehan kembali (% recovery) vitamin B ₃ yang ditambahkan dalam matrik sampel	54
Tabel 5.9. Harga presisi penyuntikan manual larutan standar vitamin B ₃ ..	54
Tabel 5.10. Harga presisi metode pada analisis kadar dalam sampel	55
Tabel 5.11. Kadar vitamin B ₃ dalam beras putih dan beras merah	56
Tabel 5.12. Kadar vitamin B ₃ dalam air cucian beras	56
Tabel 5.13. Kadar vitamin B ₃ pada beras setelah n x pencucian beras	57
Tabel 5.14. Persentase kadar vitamin B ₃ dalam beras yang terekstraksi setelah n kali pencucian beras	58

DAFTAR LAMPIRAN

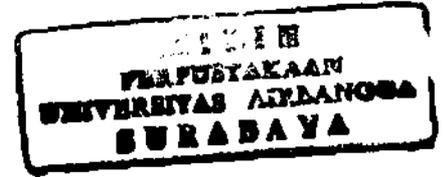
	Hal
Lampiran 1. Perhitungan faktor selektifitas (α) dan resolusi (R_s)	71
Lampiran 2. Perhitungan harga limit deteksi dan limit kuantitasi	72
Lampiran 3. Perhitungan linieritas	73
Lampiran 4. Perhitungan perolehan kembali (% recovery)	74
Lampiran 5. Perhitungan kadar vitamin B ₃ di dalam sampel	76

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1. Perhitungan faktor selektifitas (α) dan resolusi (R_s)	71
Lampiran 2. Perhitungan harga limit deteksi dan limit kuantitasi	72
Lampiran 3. Perhitungan linieritas	73
Lampiran 4. Perhitungan perolehan kembali (% recovery)	74
Lampiran 5. Perhitungan kadar vitamin B ₃ di dalam sampel	76

BAB I

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Vitamin telah terbukti memainkan peranan penting dalam kesehatan tubuh, termasuk kulit. Vitamin B₃ yang dikenal juga dengan nama niasinamida atau nikotinamida merupakan salah satu komponen vitamin B kompleks (Parfitt, 2002). Vitamin B₃ berfungsi sebagai komponen dari dua koenzim yakni nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) dan nikotinamid adenin dinukleotida difosfat (NADP). Koenzim ini berperan dalam banyak proses metabolik seperti glikolisis, respirasi jaringan, metabolisme lipid, asam amino dan purin (Flodin, 1988; Mason, 2001).

Vitamin B₃ dibutuhkan untuk memelihara kesehatan kulit, saluran pencernaan, dan sistem syaraf. Vitamin B₃ yang digunakan secara topikal, menunjukkan peningkatan kemampuan kulit untuk mempertahankan kelembaban, menjadikan kulit lebih lembut dan halus (Noonan, 2003). Selain itu, vitamin ini juga membantu mencerahkan kulit jika digunakan bersama dengan pelembab, dan juga bisa mengobati jerawat (Shalita *et al.*, 1995). Penelitian pada hewan juga telah menunjukkan kemampuan vitamin ini dalam mencegah kanker kulit yang diinduksi oleh radiasi UV B (Gensler, 1997). Selain kegunaan topikal, vitamin B₃ bisa digunakan untuk memperlambat perkembangan diabetes melitus Tipe I dan juga bisa meningkatkan produksi insulin oleh pankreas (Elliot dan Chase, 1991; Polo *et al.*, 1998; Pozzili *et al.*, 1996). Karena efeknya pada sistem syaraf, vitamin B₃ telah digunakan untuk depresi, kecemasan dan insomnia. Vitamin B₃ juga telah

digunakan pada ketergantungan alkohol, halusinasi induksi obat, dan schizophrenia. Vitamin B₃ dosis tinggi digunakan untuk memulihkan simptom rheumatoid arthritis dan osteoarthritis. Vitamin ini juga telah digunakan untuk diare dan meningkatkan digesti (Flodin, 1988).

Vitamin B₃ telah digunakan pada produk-produk kosmetik yang beredar di pasaran. Pada umumnya produk kosmetik ini ditujukan untuk menghaluskan, melembutkan dan mencerahkan kulit. Produk yang berupa *cream* dan *lotion* biasanya mengandung 1% vitamin B₃ dan yang berupa *facial foam* mengandung 0,1% vitamin B₃.

Salah satu sumber vitamin B₃ adalah beras. Kandungan vitamin B₃ dalam beras adalah 16,4 mg/kg beras putih, 54,1 mg/kg padi, dan 32,2 mg/kg *parboiled rice* (Belitz dan Grosch, 1987). Bila beras dicuci atau dimasak dengan air berlebih maka sebagian dari vitamin ini akan terekstraksi ke dalam air (Bose, 2003). Air cucian beras secara tradisional digunakan oleh sebagian masyarakat sebagai penghalus dan pelembut kulit (Soedibyo, 1998). Untuk mendapatkan efek kosmetik dari air cucian beras, secara tradisional dilakukan dengan dua cara yakni air cucian beras langsung digunakan pada kulit atau dengan cara merendam beras terlebih dahulu, kemudian beras ditumbuk sampai halus dan ditambah air secukupnya sebelum digunakan pada kulit. Efek menghaluskan dan melembutkan kulit dari air cucian beras ini mungkin disebabkan oleh adanya vitamin B₃ yang terekstraksi dari beras ke dalam air. Oleh sebab itu, seberapa besar kandungan vitamin B₃ dalam air cucian beras merupakan hal yang menarik untuk diteliti mengingat sejauh ini belum ada data mengenai hal tersebut.

Selain itu, berkurangnya kandungan vitamin B₃ dalam beras akibat terekstraksinya vitamin ini sewaktu proses pencucian beras mengakibatkan berkurangnya pula jumlah vitamin B₃ yang dikonsumsi. Hal ini bisa mengakibatkan defisiensi vitamin tersebut pada masyarakat yang menjadikan beras sebagai makanan pokoknya (Dexter, 1998). Defisiensi vitamin B₃ menimbulkan simptom yang tidak spesifik seperti kelesuan, anoreksia, kelemahan, ketidakmampuan mencerna, dan mudah marah, yang pada perkembangan akhirnya menimbulkan penyakit pellagra yang dicirikan dengan “tiga D” yakni dermatitis (terutama pada bagian kulit yang terkena sinar matahari), dementia (berkaitan dengan kebingungan, disorientasi, dan halusinasi) dan diare. Defisiensi vitamin B₃ dapat terjadi pada diet dengan asupan vitamin B₃ kurang 7,5 mg per hari (Flodin, 1988; Mason, 2001). Mengingat kurangnya asupan vitamin B₃ bisa berawal dari hilangnya vitamin tersebut sewaktu pencucian beras, maka seberapa besar pelepasan vitamin B₃ akibat pencucian beras menjadi menarik untuk diteliti.

Metode standar seperti pada AOAC (Hortwitz, 2000) untuk penetapan kandungan vitamin B₃ dapat dilakukan dengan cara: (1) metode turbidimetri secara mikrobiologi; (2) metode kolorimetri; (3) metode *continous-flow analysis*. Metode turbidimetri mikrobiologis memiliki beberapa kekurangan, seperti: biaya yang mahal, akurasi rendah, keterulangan yang kurang baik dan memakan waktu, karenanya metode ini tidak sesuai untuk analisis cepat atau penanganan sampel dalam jumlah yang besar. Sianogen bromida, reagen yang digunakan dalam metode kolorimetri dan *continous-flow analysis* memiliki sifat yang tidak stabil dan toksik. Sepertinya, volatilitas dan toksisitas yang tinggi dari sianida bromida

menjadikannya berbahaya jika digunakan dan menyulitkan dalam penanganan limbahnya (Lin *et al.*, 2000).

Metode lain yang bisa digunakan untuk menganalisis vitamin B₃ adalah Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Penetapan vitamin B₃ dalam tablet multivitamin telah dilakukan oleh Ropte dan Aieloff (1985) menggunakan plat silika gel dengan fase gerak aseton-kloroform-butanol-ammonium hidroksida 25% (30:30:40:5). Selain itu, Ismaiel *et al* (1985) melakukan penetapan vitamin B₃ dalam sediaan multivitamin dengan ekstraksi di dalam air, yang dilanjutkan KLT pada plat silika gel dengan fase gerak kloroform-etanol (60:25). Namun metode KLT ini memberikan sensitivitas dan resolusi yang rendah untuk penetapan vitamin B₃ (Fried dan Sherma, 1994).

Metode KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) juga telah digunakan untuk analisis vitamin B₃. Metode KCKT untuk analisis vitamin B₃ menggunakan kolom fase sungsang dengan sistem fase gerak pasangan ion yang beragam. Takatsuki *et al* (1987) menggunakan air yang mengandung asam heptanasulfonat 10mM sebagai sistem pasangan ion untuk analisis vitamin B₃ di dalam daging. Asam heptanasulfonat 5mM dan asetonitril (75:25, v/v) juga telah digunakan oleh Valls *et al* (2000) untuk analisis vitamin B₃ di dalam sosis. Sedangkan Stein *et al* (1995) untuk analisis vitamin B₃ di dalam sampel biologis menggunakan tetrabutylammonium fosfat dan metanol. USP 25 (2002) menggunakan natrium 1-heptanasulfonat 0,005 M dan metanol (70:30) untuk analisis vitamin B₃. Campuran natrium hexanasulfonat 2,5 mM dan metanol telah digunakan oleh Li (2002) untuk analisis vitamin B₃ di dalam tablet multivitamin. Semua metode

KCKT tersebut menggunakan kolom fase sungsang dengan sistem fase gerak pasangan ion, yang mana cara ini relatif sulit dalam pelaksanaannya.

Kromatografi gas telah banyak digunakan untuk penetapan kadar vitamin B₃. Prosser dan Sheppard (1968) mengembangkan analisis vitamin B₃ dengan menggunakan kolom campuran bifase 2.5% NPGS dan 10% SE-30, dan vitamin B₃ ditetapkan sebagai vitamin B₃ atau dirubah menjadi etilnikotinat atau N-etilnikotinamid. Pada tahun 1975, Vessman dan Stromberg menetapkan kadar vitamin B₃ pada sediaan multivitamin dengan kromatografi gas berdasarkan konversi vitamin B₃ menjadi nikotinonitril, reaksi dehidrasinya dimediasi dengan trifluoroasetat anhidrida dan dengan katalisa basa, kolom yang digunakan adalah 20% Carbowax 20 M terephthalic acid. Sedangkan Tanaka *et al* (1989) menetapkan vitamin B₃ pada daging sebagai 3-sianopyridin setelah dehidrasi oleh heptafluorobutirat anhidrida dengan kromatografi gas menggunakan kolom 5% OV-17. Ketiga metode diatas menggunakan kolom terpacking dengan detektor FID. Metode kromatografi gas untuk analisis vitamin B₃ pada minuman tonik dan minuman vitamin dilakukan oleh Lin *et al* (2000) dengan menggunakan kolom kapiler yakni CP-Sil 8 CB, metode ini dilakukan dengan injeksi langsung tanpa praperlakuan sampel, tetapi dengan penambahan internal standar 1,9-nonanediol sebelum analisis. Lin *et al* (2000) juga menetapkan kadar vitamin B₃, ester paraben, dan kafein di dalam minuman kesehatan secara simultan, analisis dilakukan dengan injeksi langsung dengan internal standar 1,9-nonanediol dan kolom CP-Sil 24 CB.

Metode kromatografi gas merupakan salah satu teknik analisa modern yang terpenting, karena memberikan sensitifitas dan resolusi yang tinggi.

Kromatografi gas bisa digunakan untuk menetapkan vitamin B₃ karena vitamin ini memiliki titik lebur yang rendah yakni 128–131°C (Anonim, 2002) dan larut dalam pelarut organik (Parfitt, 2002). Analisa vitamin B₃ yang telah dilakukan oleh Lin *et al* (2000) tanpa memerlukan prosedur praperlakuan sampel sehingga analisis bisa dilakukan dengan cepat dan mudah. Namun metode Lin *et al* sulit diterapkan untuk sampel yang mengandung air karena air bisa mempercepat *life time* fase diam kolom dan volume ekspansi uap air yang besar akan memberikan aliran balik dan sulit masuk kolom, dan molekul air juga akan memadamkan nyala api detektor nyala. Untuk itu, pada penelitian ini dikembangkan metode analisis vitamin B₃ pada sampel beras dan air cucuannya dengan terlebih dahulu dilakukan ekstraksi vitamin B₃ dari sampel dengan pelarut organik dan kemudian dianalisis dengan metode kromatografi gas.

Metode kromatografi gas untuk analisis vitamin B₃ perlu dilakukan validasi terlebih dahulu dengan beberapa parameter analisis, mengingat belum ada data validasi metode ini untuk matriks sampel beras dan air cucuannya. Pelaksanaan validasi metode dengan teliti berkaitan langsung dengan kualitas data yang dihasilkan dari suatu metode. Validasi metode ini akan menjamin bahwa pelaksanaan metode analisis yang bersifat karakteristik adalah telah sesuai dengan tujuan pelaksanaannya (Green, 1996). Parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode adalah selektifitas, akurasi, presisi, limit deteksi, limit kuantitasi, linieritas, rentang, ruggedness, dan robustness (Anonim, 2001).

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas maka permasalahan penelitiannya adalah:

1. Bagaimana kondisi optimum dan tingkat validitas (selektivitas, limit deteksi, limit kuantitasi, linieritas, akurasi, presisi) metode kromatografi gas untuk penetapan kadar vitamin B₃ dalam beras dan air cucian beras.
2. Berapakah kadar vitamin B₃ dalam beras dan air cucian beras yang ditetapkan dengan metode kromatografi gas.
3. Bagaimana pengaruh pencucian beras terhadap profil pelepasan vitamin B₃ dari beras

1.3. Tujuan Penelitian

1. Mengembangkan metode penetapan kadar vitamin B₃ dalam beras dan air cucian beras secara kromatografi gas.
2. Menentukan kadar vitamin B₃ dalam beras dan air cucian beras dengan kromatografi gas.
3. Menentukan kadar vitamin B₃ yang terekstraksi dari beras sewaktu dilakukan pencucian beras

1.4. Manfaat Penelitian

1. Memberikan kontribusi pada ilmu pengetahuan dan teknologi dalam pengembangan metode analisis vitamin B₃ dalam beras dan air cucian beras.
2. Untuk memberikan informasi kepada masyarakat tentang kadar vitamin B₃ dalam beras dan air cucian beras.

3. Untuk memberikan informasi kepada masyarakat tentang pengaruh pencucian beras terhadap kadar vitamin B₃ di dalam beras.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Beras

2.1.1. Tinjauan Umum Tentang Beras

Beras merupakan makanan pokok bagi lebih dari separuh populasi penduduk dunia. Penduduk China, India, dan Indonesia, yang semuanya berjumlah 2,5 milyar atau lebih dari separuh penduduk dunia, menjadikan beras sebagai makanan pokoknya. Dalam waktu 20 tahun kedepan, jumlah penduduk yang bergantung pada beras akan bertambah sebanyak 1,2 milyar (Bose, 2003).

Beras dapat tumbuh pada beragam kondisi tanah dan lingkungan, dan telah diproduksi oleh lebih dari 100 negara dan pada setiap benua, kecuali Antartika. Sekitar 95% beras dunia diproduksi di negara berkembang, 92% darinya di Asia. China merupakan penghasil beras utama (35,7%), diikuti India (21,3%), Indonesia (8,9%), Bangladesh (4,9%), Vietnam (4,5%), dan Thailand (3,9%). Kurang dari 5 persen dari produksi beras dunia yang memasuki pasar internasional. Pada tahun 1996, pengekspor beras utama adalah Thailand, Vietnam, Amerika Serikat, India, dan Pakistan. Sedangkan pengimport beras utama adalah Uni Eropa, Iran, Brazil, Indonesia, dan China (Dexter, 1998).

Tahapan proses penggilingan beras adalah sebagai berikut: pelepasan sekam padi pada beras kasar (beras padi) sehingga akan diperoleh beras coklat, kemudian dilakukan pemolesan untuk melepaskan kulit pelindung, kulit ari, germ, dan lapisan aleuron untuk mendapatkan produk akhir berupa beras poles atau beras putih (Belitz dan Grosch, 1987). Beras putih mengandung vitamin dan

mineral yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan beras kasar atau beras coklat. hal ini karena mineral dan vitamin terutama berada di germ dan kulit pelindung. Untuk meningkatkan nutrisi dari beras ini bisa dilakukan proses parboiling (Dexter, 1998). Sekitar 25% produksi beras dunia dilakukan dengan proses parboiling, yakni beras kasar direndam dalam air panas, lalu diuapkan dalam autoclaves, dilanjutkan dengan pengeringan dan pemolesan sehingga diperoleh produk akhir berupa beras parboiled (*parboiled rice*). Mineral dan vitamin pindah dari lapisan luar bulir ke bagian dalam endosperma, sedangkan lapisan aleurone hilang (Belitz dan Grosch, 1987).

2.1.2. Kandungan Nutrisi Beras

Beras merupakan makanan sehat dengan sejumlah alasan. Beras merupakan suatu karbohidrat kompleks. Karbohidrat kompleks didigesti secara perlahan sehingga memungkinkan tubuh memperoleh energi yang dilepaskan dalam waktu yang lama. Protein beras, merupakan salah satu protein berkualitas tinggi bila dibandingkan dengan protein dari biji-bijian lainnya. Beras mengandung seluruh asam amino esensial. Beras juga merupakan sumber yang baik untuk nutrisi esensial lainnya, seperti vitamin B, fosfat, besi, dan kalium. Beras hanya mengandung sedikit lemak dan tidak ada kolesterol dan natrium, yang membuat beras cocok bagi orang yang membutuhkan diet khusus (Bose, 2003). Kandungan nutrisi dari beras bisa dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Kandungan nutrisi beras (Anonim, 2003)

Kandungan nutrisi: 100 g	Beras putih	Beras coklat
Kalori, kcal	361	362
Air, g	10.2	11.2
Lemak Total, g	0.8	2.4
Fiber, g	0.6	2.8
Kalsium, mg	8	12
Posfor, mg	87	255
Kalium, mg	111	326
Natrium, mg	31	12
Vitamin B ₁ , mg	0.07	0.26
Vitamin B ₂ , mg	0.02	0.04
Vitamin B ₃ , mg	1.8	5.5
Protein, g	6	7.4
Karbohidrat, g	82.0	77.7

Sumber: Thai Food Composition Table (1999), Institute of Nutrition, Mahidol University

2.2. Tinjauan tentang Vitamin B₃

2.2.1. Tinjauan Umum

Vitamin B₃ yang dikenal juga dengan nama niasinamida atau nikotinamida merupakan salah satu dari dua bentuk dasar vitamin B kompleks niasin. Istilah niasin digunakan sebagai suatu istilah kolektif yang merujuk baik kepada nikotinamid atau asam nikotinat (bentuk dasar niasin yang lain). Vitamin B₃ dan asam nikotinat memiliki aktifitas vitamin yang identik, namun aktifitas farmakologisnya sangat berbeda. Sebagai vitamin, vitamin B₃ berfungsi sebagai komponen dari dua koenzim yakni nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) dan nikotinamid adenin dinukleotida difosfat (NADP). Koenzim ini berperan dalam banyak proses metabolik seperti glikolisis, respirasi jaringan, metabolisme lipid, asam amino dan purin (Mason, 2001).

Vitamin B₃ dibutuhkan untuk memelihara kesehatan kulit, saluran pencernaan, dan sistem syaraf. Vitamin B₃ yang digunakan secara topikal, menunjukkan peningkatan kemampuan kulit untuk mempertahankan kelembaban, menjadikan kulit lebih lembut dan halus (Noonan, 2003). Selain itu, vitamin ini juga membantu mencerahkan kulit jika digunakan bersama dengan pelembab, dan juga bisa mengobati jerawat (Shalita *et al.*, 1995). Penelitian pada hewan juga telah menunjukkan kemampuan vitamin ini dalam mencegah kanker kulit yang diinduksi oleh radiasi UV B (Gensler, 1997). Selain kegunaan topikal, vitamin B₃ bisa digunakan untuk memperlambat perkembangan diabetes melitus Tipe I dan juga bisa meningkatkan produksi insulin oleh pankreas (Elliot dan Chase, 1991; Polo *et al.*, 1998; Pozzili *et al.*, 1996). Karena efeknya pada sistem syaraf, vitamin B₃ telah digunakan untuk depresi, kecemasan dan insomnia. Vitamin B₃ juga telah digunakan pada ketergantungan alkohol, halusinasi induksi obat, dan schizophrenia. Vitamin B₃ dosis tinggi digunakan untuk memulihkan simptom rheumatoid arthritis dan osteoarthritis. Vitamin ini juga telah digunakan untuk diare dan meningkatkan digesti (Flodin, 1988).

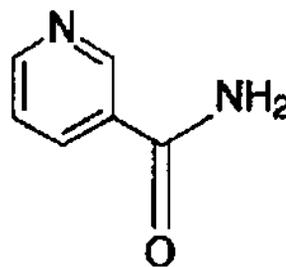
Simptom defisiensi vitamin B₃ dapat terjadi pada diet dengan asupan vitamin B₃ kurang 7,5 mg per hari. Defisiensi vitamin B₃ menimbulkan simptom yang tidak spesifik seperti kelesuan, anoreksia, kelemahan, ketidakmampuan mencerna, dan mudah marah, yang pada perkembangan akhirnya menimbulkan penyakit pellagra yang dicirikan dengan “tiga D” yakni dermatitis (terutama pada bagian kulit yang terkena sinar matahari), dementia (berkaitan dengan kebingungan, disorientasi, dan halusinasi) dan diare (Flodin, 1988; Mason, 2001). Pengobatan dan pencegahan defisiensi vitamin ini dapat dilakukan dengan

pemberian asam nikotinat dan vitamin B₃, namun vitamin B₃ lebih disukai karena tidak menimbulkan vasodilatasi (Parfitt, 2002).

Kebutuhan orang dewasa akan vitamin B₃ adalah berkisar antara 15-20 mg/hari. Sumber vitamin B₃ pada makanan adalah ragi, kacang tanah, beras, gandum, daging, ikan, kentang, dan sayuran hijau. Pada umumnya, sebagian vitamin B₃ mudah hilang ketika makanan dimasak atau diproses (Parfitt, 2002).

2.2.2. Sifat Fisika Kimia Vitamin B₃

Vitamin B₃ yang telah dikenal sebagai nikotinamid, juga dikenal sebagai niasinamid, amida asam nikotinat, nikotilamid, vitamin PP, atau pyridin-3-karboksamid. Rumus molekul vitamin B₃ adalah C₆H₆N₂O dengan berat molekul 122,1 (Budavari S, 2001) serta memiliki struktur seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Struktur Kimia Vitamin B₃ (Anonim, 2001)

Vitamin B₃ berupa serbuk kristal putih atau kristal tidak berwarna, tidak berbau atau hampir tidak berbau. Satu gram vitamin B₃ larut dalam lebih kurang 1 ml air, lebih kurang 1,5 ml alkohol, dan lebih kurang 10 ml gliserol, larut dalam etil asetat, agak sukar larut dalam kloroform, dan sukar larut dalam eter dan aseton (Anonim, 2001; Budavari, 2001). Larutannya netral terhadap lakmus. Larutan

netral bisa diautoclave. Vitamin ini stabil terhadap panas dan oksigen (Flodin, 1988). Jarak lebur vitamin B₃ adalah antara 128-131°C (Anonim, 2001).

Vitamin B₃ akan terhidrolisa menjadi asam nikotinat oleh pemanasan dengan asam atau alkali. Sintesis secara komersial untuk mendapatkan vitamin B₃ dilakukan dengan esterifikasi asam nikotinat dengan metanol dan selanjutnya dilakukan amminolisis (Gennaro, 2000).

2.2.3. Metode Penetapan Kadar Vitamin B₃

Penetapan kadar vitamin B₃ dalam makanan, obat, dan sampel biologis bisa dilakukan dengan metode kimia atau dengan penetapan mikrobiologis. Penetapan secara mikrobiologi dilakukan dengan menggunakan *Lactobacillus arabinosus* (*L. Plantarum*) sebagai organisme uji. Dengan menggunakan organisme ini, asam nikotinat dan vitamin B₃ yang berada pada sampel yang sama bisa ditetapkan kadarnya masing-masing (Gennaro, 2000). Penetapan mikrobiologis ini pada AOAC dilakukan baik dengan metode titrimetri ataupun turbidimetri (Hortwitz, 2000).

Metode kimia untuk penetapan kadar vitamin B₃ bisa dilakukan dengan titrasi bebas air, kolorimetri, spektrofotometri, *continous-flow analysis*, kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi gas, dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Metode yang digunakan oleh British Pharmacopeia 2001 dan Kodeks Makanan Indonesia 2001 untuk menetapkan kadar vitamin B₃ adalah titrasi bebas air. Titrasi dilakukan dengan menggunakan asam perklorat dan indikator kristal violet.

Metode kolorimetri, spektrofotometri, dan *continuous-flow analysis* digunakan pada AOAC (Hortwitz, 2000) untuk menetapkan kadar vitamin B₃. Ketiga metode ini sama-sama diperlakukan dengan sianogen bromida. Sianogen bromida akan memutus ikatan karbon-nitrogen pada cincin pyridin, kemudian direaksikan dengan amin aromatik yang akan menghasilkan kompleks berwarna yang bisa diukur dengan kolorimetri atau spektrofotometri (Gennaro, 2000). Amin aromatik yang digunakan pada kolorimetri dan *continuous-flow analysis* adalah asam sulfanilat dan pada spektrofotometri digunakan asam barbiturat (Hortwitz, 2000).

Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) bisa digunakan untuk analisis vitamin B₃. Penetapan vitamin B₃ dalam tablet multivitamin telah dilakukan oleh Ropte dan Aieloff (1985) menggunakan plat silika gel dengan fase gerak aseton-kloroform-butanol-ammoniumhidroksida 25% (30:30:40:5), kuantifikasi dilakukan dengan densitometri pada 262 nm. Selain itu, Ismaiel *et al* (1985) melakukan penetapan vitamin B₃ dalam sediaan multivitamin dengan ekstraksi di dalam air, yang dilanjutkan KLT pada plat silika gel dengan fase gerak kloroform-etanol (60:25). Deteksi bercak dilakukan dengan uap anilin dan sianogen bromida yang akan memberikan warna bercak kuning, dan kuantifikasi dilakukan dengan densitometri pada 468 nm. Namun metode KLT ini memberikan sensitivitas dan resolusi yang rendah untuk penetapan vitamin B₃ (Fried dan Sherma, 1994).

Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) juga telah digunakan untuk analisis vitamin B₃. Metode KCKT untuk analisis vitamin B₃ menggunakan kolom fase sungsang dengan sistem fase gerak pasangan ion yang beragam. Takatsuki *et al* (1987) menggunakan air yang mengandung asam heptanasulfonat

10mM sebagai sistem pasangan ion untuk analisis vitamin B₃ di dalam daging. Asam heptanasulfonat 5mM dan asetonitril (75:25, v/v) juga telah digunakan oleh Valls *et al* (2000) untuk analisis vitamin B₃ di dalam sosis. Sedangkan Stein *et al* (1995) untuk analisis vitamin B₃ di dalam sampel biologis menggunakan tetrabutylammonium fosfat dan metanol. USP 25 (2002) menggunakan natrium 1-heptanasulfonat 0,005 M dan metanol (70:30) untuk analisis vitamin B₃. Campuran natrium hexanasulfonat 2,5 mM dan metanol telah digunakan oleh Li (2002) untuk analisis vitamin B₃ di dalam tablet multivitamin.

Kromatografi gas telah banyak digunakan untuk penetapan kadar vitamin B₃. Prosser dan Sheppard (1968) mengembangkan analisis vitamin B₃ dengan menggunakan kolom campuran bifase 2,5% NPGS dan 10% SE-30, dan vitamin B₃ ditetapkan sebagai vitamin B₃ atau dirubah menjadi etilnikotinat atau N-etilnikotinamid. Pada tahun 1975, Vessman dan Stromberg menetapkan kadar vitamin B₃ pada sediaan multivitamin dengan kromatografi gas berdasarkan konversi vitamin B₃ menjadi nikotinonitril, reaksi dehidrasinya dimediasi dengan trifluoroasetat anhidrida dan dengan katalisa basa, kolom yang digunakan adalah 20% Carbowax 20 M terephthalic acid. Sedangkan Tanaka *et al* (1989) menetapkan vitamin B₃ pada daging sebagai 3-sianopyridin setelah dehidrasi oleh heptafluorobutirat anhidrida dengan kromatografi gas menggunakan kolom 5% OV-17. Ketiga metode diatas menggunakan kolom terpacking dengan detektor FID. Metode kromatografi gas untuk analisis vitamin B₃ pada minuman tonik dan minuman vitamin dilakukan oleh Lin *et al* (2000) dengan menggunakan kolom kapiler yakni CP-Sil 8 CB, metode ini dilakukan dengan injeksi langsung tanpa praperlakuan sampel, tetapi dengan penambahan internal standar 1,9-nonanediol

sebelum analisis. Batas deteksi dari metode ini adalah 2-5 µg/ml dan perolehan kembali (recovery) adalah 94-98% untuk minuman vitamin dan 93-108% untuk minuman tonik. Lin *et al.* (2000) juga menetapkan kadar vitamin B₃, ester paraben, dan kafein di dalam minuman kesehatan secara simultan, analisis dilakukan dengan injeksi langsung dengan internal standar 1,9-nonanediol dan kolom CP-Sil 24 CB.

2.3. Tinjauan Tentang Ekstraksi

Ekstraksi pelarut adalah teknik pemisahan komponen dari campuran zat berdasarkan pada perpindahan solut dari satu pelarut ke pelarut lain yang tidak saling campur.

Jumlah solut yang terekstraksi tergantung pada koefisien distribusinya. Dalam hal ini berlaku hukum Nernst yang menyatakan bahwa pada kesetimbangan, zat akan terdistribusi di antara dua pelarut yang tidak saling campur dengan perbandingan yang konstan pada temperatur dan tekanan yang konstan. Perbandingan konsentrasi zat diantara dua pelarut tersebut, dinyatakan sebagai koefisien distribusi (K_d) yang dirumuskan sebagai berikut:

$$K_d = \frac{\text{konsentrasi zat dalam pelarut x}}{\text{konsentrasi zat dalam pelarut y}}$$

Untuk menentukan efisiensi suatu pelarut dapat mengekstraksi suatu senyawa dari pelarut keduanya kita menggunakan persamaan Glasstone. Jika *w* gram zat terlarut diekstraksi berulang pada *V*₁ mL pelarut pertama dan *V*₂ mL pelarut kedua yang tidak bercampur dengan pelarut pertama dan *w*₁ adalah jumlah (g) zat terlarut yang terdapat dalam pelarutnya setelah diekstraksi sebanyak satu

kali dengan pelarut lain, konsentrasi zat terlarut yang terdapat dalam pelarut pertama adalah w_1/V_1 (g/mL) dan konsentrasi zat terlarut dalam pelarut pengestraksi adalah $(w - w_1)/V_2$ (g/mL), maka koefisien distribusi menjadi:

$$K = \frac{\text{konsentrasi zat dalam pelarut pertama}}{\text{konsentrasi zat dalam pelarut pengestraksi}} = \frac{w_1/V_1}{(w - w_1)/V_2}$$

$$w_1 = w \frac{KV_1}{KV_1 + V_2}$$

Jika ekstraksi dilakukan berulang sebanyak n kali ekstraksi, maka:

$$W_n = w \left(\frac{KV_1}{KV_1 + V_2} \right)^n$$

Dari persamaan di atas terlihat bahwa ekstraksi akan efisien jika harga n besar dan V_2 kecil, atau jika ekstraksi dilakukan berulang kali dengan bagian pelarut pengestraksi yang kecil. Teori ini berlaku untuk campuran dua pelarut yang tidak saling bercampur (Martin, 1993).

2.4. Tinjauan Tentang Kromatografi Gas

2.4.1. Tinjauan Umum

Kromatografi gas adalah salah satu teknik kromatografi, dimana yang bertindak sebagai fase diam dapat berupa fase padat atau fase cair dan sebagai fase gerak adalah gas. Pada perkembangan yang pertama kromatografi gas memakai fasa diam padat atau azas adsorpsi yang dikenal sebagai Kromatografi Gas Padat (KGP). Saat ini KGP sudah sangat jarang dipakai lagi mengingat beberapa kelemahannya antara lain: terjadi adsorpsi semi permanen dengan akibat terjadinya pengekoran puncak kromatogram (*tailing*), waktu analisisnya lama, resolusi yang tidak bagus dan sistem keseimbangan distribusi analit di dalam gas-

padat tidak ideal. Dengan mengacu pada azas partisi pada kromatografi kertas para kromatografiwan mencoba mengganti fasa diam padat dengan cairan netral dan stabil dan tidak mudah menguap yang disalutkan pada padatan pendukung sebagai lapisan tipis. Pemakaian azas partisi pada kromatografi gas dikenal sebagai Kromatografi Gas Cair (KGC). KGC memberikan hasil yang jauh lebih baik dibandingkan KGP antara lain: puncak kromatogram yang bagus (*Gaussian Peak*), waktu analisis lebih cepat, resolusi yang bagus dan terjadi sistem keseimbangan distribusi analit di dalam gas-cair yang ideal. Dengan alasan tersebut hampir secara keseluruhan saat ini kromatografi gas memakai azas partisi atau KGC, sehingga pada saat ini yang dimaksudkan dengan kromatografi gas adalah KGC (Mulja dan Suharman, 1995; Skoog *et al.*, 1998).

Demikian juga pada pemakaian dua macam kolom pada kromatografi gas yaitu kolom konvensional terpacking (*Packed Column*) yang sudah jarang dipakai dan kolom kapiler (*Capillary Column*) yang umum dipakai saat ini. Hampir 95% kromatograf gas yang ada diseluruh dunia memakai kolom kapiler. Sehingga saat ini yang dimaksudkan dengan kromatografi gas adalah kromatografi gas kolom kapiler (*Capillary Gas Chromatography*) atau dikenal juga sebagai kromatografi gas resolusi tinggi (*High Resolution Gas Chromatography* = HRGC).

Keuntungan metode kromatografi gas adalah:

1. Aliran fasa mobil gas dengan kecepatan alir volume ataupun tekanan yang terkontrol dan terkendali.
2. Sangat mudah terjadi pencampuran uap sampel dengan fasa mobil sebagai efluen yang homogen.
3. Banyak macam pilihan detektor yang bersifat selektif atau semesta (*universal*).

4. Pemisahan fisik terjadi didalam kolom yang jenisnya banyak dengan panjang, diameter, ketebalan lapisan salut tipis yang tertentu dan temperatur tanur yang bisa diprogram.
5. Kromatograf gas bisa digabung dengan instrumen fisiko kimia *multiplex* sebagai teknik terpadu, dimana kromatograf gas difungsikan sebagai pemisah selektif dan instrumen *multiplex* yang tergabung berfungsi sebagai penganalisis yang spesifik. Sebagai contoh instrumen terpadu GC/FT-IR/MS dan GC-UV.

Namun demikian ada beberapa kelemahan pada metode kromatografi gas, diantaranya adalah banyak analit yang sulit diatsirikan atau bisa diatsirikan akan tetapi mudah terdekomposisi oleh temperatur yang tinggi. Disamping itu harga sebuah kromatograf gas dan biaya pelaksanaannya masih cukup mahal (Mulja dan Sugijanto, 1994; Miller dan Crowther, 2000)

2.4.2. Tinjauan Tentang Instrumen Kromatografi Gas

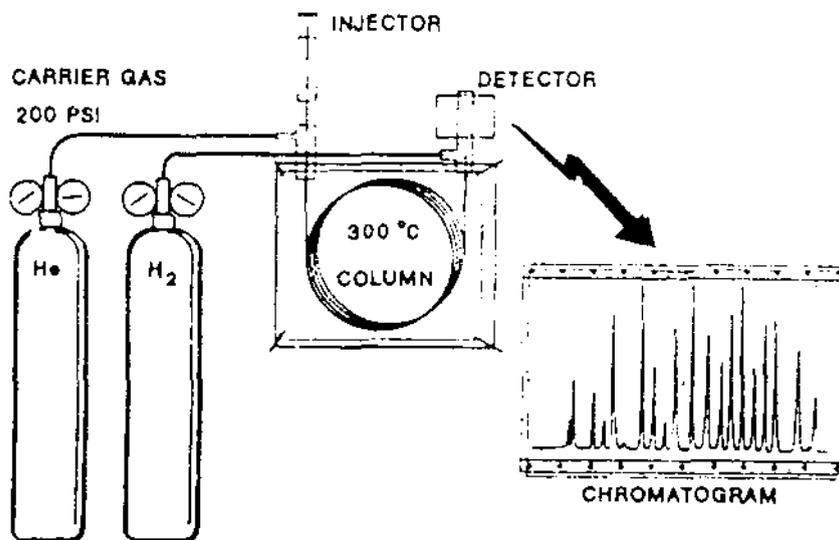
Instrumen kromatografi gas secara umum terdiri dari gas pembawa, sistem inlet, oven, kolom dan detektor. Instrumen kromatografi gas dapat dilihat pada gambar 2.2.

2.4.2.1. Gas

Pada kromatografi gas ada tiga macam gas yang fungsi pemakaiannya berbeda yaitu: gas pembawa (fasa mobil), gas bantu detektor (gas bakar pada detektor nyala/*flame detector*) dan *capillary make up gases* (untuk menaikkan kecepatan *effluent* ke detektor dan memperkecil volume mati detektor) yang diperlukan pada HRGC.

Gas pembawa yang umum dipakai sebagai fasa mobil adalah : He, Ar, H₂, N₂ dan CO₂, dengan syarat kualifikasi antara lain :

- Lambam (*inert*) dari segi kimia dan fisiko kimia.
- Kemurniannya tinggi, 99,995% pada HRGC.
- Bebas O₂, kadar H₂O sangat rendah
- Aman , tidak mudah meledak.
- Mudah didapat dengan harga relatif murah.



Gambar 2.2. Bagan Instrumen Kromatografi Gas (Mulja dan Sugijanto, 1994)

Capillary make up gases hanya dipakai pada HRGC dan tidak masuk kedalam kolom. Fungsi dari *capillary make up gases* adalah untuk meningkatkan aliran *effluent* ke detektor dan meminimalkan volume mati detektor (*detector death volume*). Tujuan akhir pemakaian *capillary make up gases* adalah untuk mencegah terjadinya pelebaran puncak kromatogram karena penurunan drastis kecepatan alir *effluent* pada ujung kolom. *Capillary make up gases* bisa saja dari

gas fasa mobil yang dialirkan terpisah (*split*) dengan kecepatan alir yang sama dengan kecepatan alir fasa mobil. Persyaratan kemurnian *capillary make up gases* sama dengan gas fasa mobil (Mulja dan Suharman, 1995; Skoog *et al.*, 1998)

Gas bantu detektor dipakai apabila detektor yang dipakai adalah detektor nyala (*Flame Detector*), yang bisa dioperasikan dengan nyala. Kestabilan nyala detektor dan kepekaannya sangat dipengaruhi keberadaan gas bantu nyala serta kecepatan alir optimal gas bantu nyala. Pada umumnya dipakai dua kombinasi gas bantu nyala, sebagai contoh pada pemakaian detektor FID (*Flame Ionization Detector*) dipakai dua macam gas bantu nyala yaitu : H₂ (dengan kemurnian 99,95%) dengan kecepatan alir 30–60 ml/menit dan aliran udara kering dengan kecepatan sepuluh kalinya (300–600 ml/menit) (Mulja dan Suharman, 1995).

2.4.2.2. Pemasukan Sampel

Sampel yang bisa dianalisis dengan metode kromatografi gas umumnya bentuk cair akan tetapi sampel bentuk padat dan gas bisa juga dianalisis dengan memakai sistem pemasuk sampel yang khusus. Sampel bentuk cair yang telah dipreparasi (pemisahan kimia ataupun derivatisasi) selanjutnya disaring dan diambil saksama 0,5–2 µl dengan jarum suntik mikro (*micro syringe*) bebas gelembung udara. Pemasukan sampel secara manual dengan jarum suntik mikro ada kendalanya antara lain jaminan ketepatan volume sampel yang akan diinjeksikan dan tidak efektif untuk sampel semacam yang jumlahnya banyak. Untuk penanggulangan kendala tersebut saat ini telah diperkenalkan pemasuk sampel injeksi otomatis (*automatic injector*) dan *auto sampler* untuk penentuan analisis jumlah sampel semacam yang banyak (sampai 200 sampel).

Untuk sampel padat atau kental seperti sabun, oli, perkat, plastik, tanah dan bahan bersifat korosif yang tidak memungkinkan untuk disuntikkan langsung kedalam kromatograf gas dapat dianalisis dengan metode kromatografi gas dengan memanfaatkan pemasuk sampel *Head Space Sampling*.

Untuk sampel berbentuk gas atau cairan untuk transfer reaksi dipakai pemasuk sampel *sampling valves*. Ada dua jenis pemasuk sampel *sampling valves* yang fungsinya berbeda untuk sampel gas dan untuk cairan transfer reaksi (Mulja dan Suharman, 1995; Skoog *et al.*, 1998)

2.4.2.3. Sistem Inlet

Sistem inlet sebagai gerbang suntik sampel dan sebagai penentu keberhasilan pekerjaan analisis. Sistem inlet sebagai unit dalam satu kesatuan unit pada kromatograf gas dipersyaratkan dengan ketat dari segi ketepatan, prinsip bekerjanya harus jelas dan hasil analisis yang terulangkan. Untuk itu sistem inlet telah mengalami peningkatan kemajuan teknologi agar supaya terjadinya diskriminasi komponen-komponen didalam sampel sudah mulai terjadi didalam ruang inlet. Beberapa sistem inlet yang telah dikenal untuk dipakai pada kromatograf antara lain adalah :

1. Inlet untuk kolom terpacking.
 - Packed column inlet*
 - Septum purge packed column inlet*
2. Inlet untuk kolom kapiler (HRGC)
 - Capillary direct inlet*
 - Split – split less inlet*
 - Cold on column inlet*

3. Inlet untuk kolom terpacking dan kolom kapiler

-Electronic Pressure Control (EPC) inlet (Mulja dan Sugijanto, 1994)

2.4.2.4. Oven

Kolom kromatografi digantungkan pada oven kromatograf gas yang dapat dipanaskan pada suhu tertentu. Fungsi oven untuk menjaga temperatur agar tetap konstan baik yang secara isoterm atau terprogram. Temperatur oven dapat diatur dari temperatur kamar sampai temperatur 450°C, yang pengaturannya disesuaikan dengan titik didih dari zat-zat yang dipisahkan. Jika di dalam suatu campuran mengandung komponen-komponen yang titik didihnya jauh berbeda, sebaiknya digunakan oven dengan temperatur terprogram (Mulja dan Suharman, 1995)

2.4.2.5. Kolom

Kolom bagi kromatografi gas memegang peran yang sangat penting sehingga diibaratkan sebagai jantung kromatograf gas. Hal ini karena proses pemisahan komponen-komponen sampel terjadi pada kolom.

Tabel 2.2. Fase Diam Yang Banyak Digunakan (Miller dan Crowther, 2000)

Tipe	Contoh Kolom Kapiler	Contoh Kolom Terpacking
Polimer silikon		
Dimetil silikon	DB-1	SE-30, OV-1, OV-101
5% Fenil	DB-5	SE-54
50% Fenil	DB-17	OV-17
Trifluoropropil	-	OV-210
Disianoail	DB-23	OV-275
Poligliserol	DB-WAX	Carbowax 20 M

Berdasarkan jenis pengisi atau diameter bagian dalamnya, kolom dibagi menjadi kolom terpacking dan kolom kapiler. Kolom kapiler dibedakan lagi menjadi: WCOT (*Wall-Coated Open Tubular*), PLOT (*Porous-Layer Open*

Tubular), dan SCOT (*Support-Coated Open Tube*). Tabel 2.2 memberikan daftar fase diam yang paling banyak digunakan.

2.4.2.6. Detektor

Detektor dalam sistem kromatografi gas berperan menghasilkan signal untuk suatu kromatogram. Signal ini nantinya akan berguna untuk analisis kualitatif dan kuantitatif terhadap komponen-komponen sampel.

Pada analisis dengan kromatografi gas, setiap substansi selain gas pembawa keluar dari kolom senantiasa dihasilkan suatu signal sebanding dengan jumlah komponen. Besarnya signal sebanding dengan konsentrasi komponen dari zat yang bersangkutan. Signal elektrik yang dihasilkan kemudian diperkuat dengan suatu penguat elektronik dan disajikan dalam bentuk gambar yang tergantung oleh waktu. Gambar tersebut dikenal dengan istilah kromatogram yang didalamnya tampak peak-peak komponen sampel. Dari kromatogram selanjutnya dapat diketahui nilai maksimum dari peak dan waktu retensinya. Dengan bantuan waktu retensi dapat diduga secara kualitatif senyawa dalam sampel. Sementara berdasarkan luas puncak dapat diketahui kadar suatu senyawa melalui bantuan suatu pembanding.

Sejak kali pertama kromatograf gas memasuki pasar (1952) sampai saat ini telah diperkenalkan 13 macam detektor, dua diantaranya sebagai instrumen terpadu yaitu MSD dan FT-IR yang berfungsi sebagai penganalisis spesifik. Detektor kromatograf gas tersebut adalah: *Thermal Conductivity Detector* (TCD), *Flame Ionization Detector* (FID), *Electron Capture Detector* (ECD), *Nitrogen Phosphorus Detector* (NPD), *Flame Photometric Detector* (FPD), *Electrolytic Conductivity Detector* (ELCD), *Photo Ionization Detector* (PID), *Mass Selective*

Detector (MSD), *Fourier Transform–Infrared Detector* (FT-IR D), *Atomic Emission Detector* (AED), *Helium Ionization Detector* (HID), *Redox Chemiluminescence Detector* (RCD), dan *Thermionic Ionization Detector* (TID). (Mulja dan Suharman, 1995; Skoog *et al.*, 1998)

2.4.3. Parameter Kromatografi

Parameter kromatografi yang lazim digunakan adalah:

2.4.3.1. Waktu Tambat (t_R)

Waktu tambat adalah waktu yang diperlukan solut untuk menempuh jarak sepanjang kolom. Waktu tambat untuk setiap senyawa mempunyai harga yang berbeda dan bersifat karakteristik, tetapi tidak spesifik. (Skoog *et al.*, 1998).

2.4.3.2. Faktor Selektifitas (α)

Harga α berhubungan dengan besarnya koefisien partisi relatif antara dua zat dan merupakan perbandingan waktu tambat antara komponen A dan B yang dirumuskan dengan persamaan:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} = \frac{(t'_R)_B}{(t'_R)_A}$$

Keterangan:

K_B = koefisien partisi untuk zat B yang lebih kuat tertahan

K_A = koefisien partisi untuk zat A yang lebih lemah tertahan

Untuk pemisahan yang baik ditunjukkan dengan harga $\alpha > 1$, artinya kedua puncak komponen dapat terpisah (Skoog *et al.*, 1998).

2.4.3.3. Derajat Keterpisahan atau Resolusi (R_s)

Resolusi adalah parameter yang menggambarkan pemisahan antara 2 puncak komponen sampel dalam kolom.

Resolusi dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$R_s = \frac{t_{RA} - t_{RB}}{0,5 (W_A + W_B)}$$

Keterangan: W = lebar dasar puncak

Harga resolusi ≥ 1 (1 - 1,5) dapat diterima untuk analisis kualitatif dan kuantitatif (Skoog *et al.*, 1998).

2.4.4. Analisis Kualitatif dan Kuantitatif dengan Kromatografi Gas

Kromatografi gas dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif.

Untuk analisis kualitatif pada kromatografi gas ditempuh beberapa cara:

- membandingkan waktu tambat (t_R) analit dengan SRM (*Standart Reference Material*)
- dengan cara *spiking*, penambahan SRM kedalam sampel akan menaikkan tanggapan detektor sampel pada puncak kromatogram analit.
- dengan cara perhitungan RRT (*Relative Retention Time*) terhadap dua puncak.
- dengan memakai instrumen terpadu GC-MS atau GC/FT-IR/MS, setiap puncak kromatogram akan bisa ditentukan macamnya zat kimianya sampai struktur molekulnya dengan bantuan *library standart* didalam perangkat lunak komputer yang terpasang pada instrumen terpadu tersebut.
- dengan memakai MSD (*Mass Selective Detector*), cara analisis yang sama dengan instrumen terpadu, bedanya hanya pada kemampuan penentuan

rentang massa (M_R) analit, sistem pemasuk sampel dan harga instrumen (Mulja dan Suharman, 1995; Skoog *et al.*, 1998)

Sedangkan untuk analisis kuantitatif dapat digunakan luas area kromatogram. Untuk analisis kuantitatif dari zat-zat dalam campuran dapat ditetapkan dengan metode standar eksternal dan standar internal. Adapun cara perhitungan dengan metode standar eksternal adalah sebagai berikut:

$$C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s$$

dimana,

- C_x : konsentrasi sampel
- C_s : konsentrasi standar
- A_s : luas area kromatogram standar
- A_x : luas area kromatogram sampel

Persamaan diatas dapat berlaku apabila ada hubungan linier antara konsentrasi standar dengan luas area kromatogram standar. Kelemahan dari metode eksternal ini adalah adanya faktor variasi volume penginjeksian dan proses ekstraksi sampel yang tidak sempurna. Untuk mengurangi kesalahan tersebut digunakan standar internal, dimana pada metode ini ditambahkan suatu zat lain pada sampel yang konsentrasinya sudah diketahui, sehingga pada penetapan kadar dengan metode standar internal ini sampel maupun zat internal standar sama-sama mengalami proses ekstraksi, dengan demikian sampel dan zat standar internal akan sama-sama mengalami pengurangan kadar. Untuk perhitungan dengan standar internal adalah:

$$C_x = \frac{A_x/A_{ist}}{A_s/A_{ist}} \times C_s$$

Dimana,

- C_x : konsentrasi sampel
- C_s : konsentrasi standar
- A_x : luas area kromatogram sampel

Aist : luas area kromatogram standar internal
Ast : luas area kromatogram standar

Persamaan di atas berlaku apabila ada hubungan linier antara perbandingan luas puncak kromatogram terhadap kadar standar (Mulja dan Suharman, 1995; Skoog *et al.*, 1998)

2.5. Tinjauan tentang Validasi Metode

Validasi metode adalah proses terdokumentasi yang menjamin bahwa pelaksanaan metode analisis yang bersifat karakteristik adalah telah sesuai dengan tujuan pelaksanaannya. Atau dengan kata lain kebenaran hasil analisis akan terjamin bila telah dilakukan validasi terlebih dahulu terhadap metode analisis yang hendak dipakai. Karakteristik kinerja analisis dinyatakan sebagai parameter analisis. Parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis adalah akurasi, presisi, spesifisitas atau selektifitas, batas deteksi, batas kuantitasi, linieritas, rentang, *ruggedness*, dan *robustness* (Green, 1996; Anonim, 2001).

2.5.1. Akurasi

Akurasi suatu metode merupakan keterdekatan nilai pengukuran dengan nilai sebenarnya dari analit dalam sampel. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (% *recovery*) dengan cara melakukan analisis terhadap analit yang ditambahkan ke dalam sampel zat dalam jumlah yang diketahui. Penentuan akurasi dilakukan dengan menggunakan minimal 9 kali pengukuran yang meliputi minimal 3 macam konsentrasi dan 3 kali replikasi untuk masing-masing konsentrasi (Anonim, 2001; Anonim, 2002)

2.5.2. Presisi

Presisi suatu metode analisis merupakan sejumlah pencaran hasil yang diperoleh dari analisis berulang kali pada suatu sampel homogen. Presisi biasanya dinyatakan dengan koefisien variasi (*Coefficient of Variation = CV*) dan simpangan baku relatif (*Relative Standard Deviation = RSD*). Penentuan harga presisi menggunakan minimal 9 kali pengukuran yang meliputi minimal 3 macam konsentrasi dan 3 kali replikasi untuk masing-masing konsentrasi atau menggunakan minimal 6 kali pengukuran pada konsentrasi uji 100% (Anonim, 2001; Anonim, 2002).

2.5.3. Selektifitas

Selektifitas atau spesifisitas metode analisis adalah kemampuan suatu metode untuk mengukur dengan akurat respon analit diantara seluruh komponen sampel potensial yang mungkin ada dalam matrik sampel. Selektifitas ditentukan dengan membandingkan hasil dari analisis sampel yang mengandung pengotor dengan hasil sampel analit murni (Green, 1996).

2.5.4. Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi

Limit deteksi adalah konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat dideteksi, tetapi tidak perlu secara kuantitatif. Sedangkan limit kuantitasi adalah konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima dalam kondisi percobaan yang ditetapkan. Batas deteksi dan batas kuantitasi dinyatakan sebagai konsentrasi analit (misalnya persen, ppm, mg/mL) dalam sampel zat. Pada analisis instrumental, penentuan limit deteksi dan limit kuantitasi dilakukan dengan membandingkan pengukuran

respon sinyal dari sampel dengan konsentrasi analit yang rendah dengan sinyal sampel blanko (noise), dimana rasio sinyal/noise yang dapat diterima untuk limit deteksi adalah 2:1 atau 3:1 dan untuk limit kuantitasi rasionya adalah 10: 1 (Green, 1996; Miller dan Crowther, 2000).

2.5.5. Linieritas

Linieritas metode analisis adalah kemampuan (dalam rentang penggunaan) untuk mendapatkan hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi (jumlah) analit di dalam sampel. Linieritas dinyatakan dengan koefisien korelasi (r). Persyaratan data linieritas yang bisa diterima jika memenuhi nilai koefisien korelasi (r) $> 0,999$ atau nilai variasi fungsi (V_{xo}) $\leq 2\%$ (Green, 1996; Miller dan Crowther, 2000).

2.5.6. Ruggednes dan Robustness

Ruggednes metode analisis adalah derajat reproduibilitas metode analisis yang dilakukan dengan melakukan analisis sampel yang sama dalam variasi kondisi pengujian normal seperti laboratorium, analis, instrumen, lot pereaksi, waktu pelaksanaan pengujian, suhu selama pengujian dan hari yang berbeda.

Robustness metode analisis adalah ukuran kemampuan metode untuk tetap bertahan terhadap pengaruh kecil tapi dilakukan dengan sengaja dengan membuat variasi dalam parameter metode analisis dan memberikan indikasi kehandalan metode selama penggunaan normal.

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

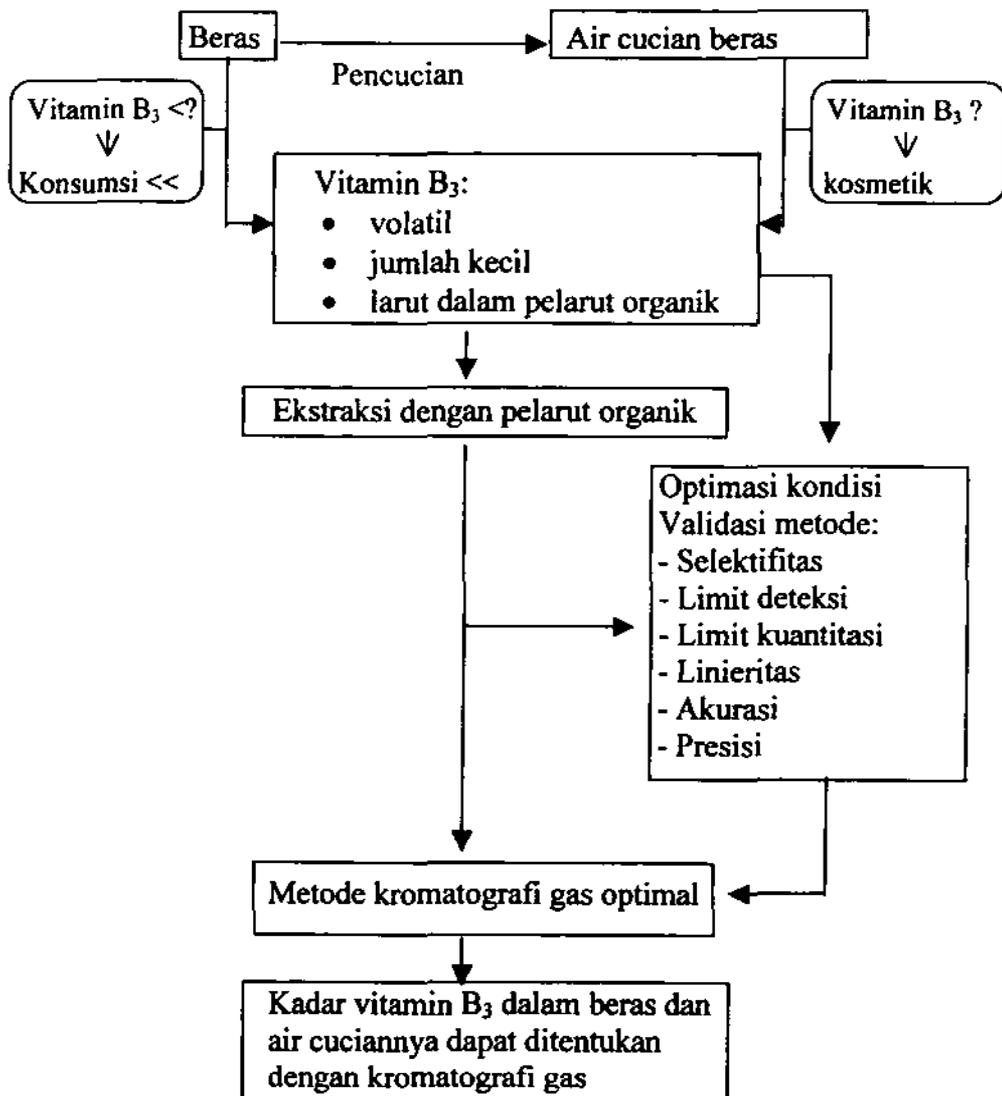
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Vitamin B₃ telah digunakan pada produk-produk kosmetik yang beredar dipasaran. Pada umumnya produk kosmetik ini ditujukan untuk menghaluskan, melembutkan dan mencerahkan kulit. Secara tradisional, salah satu cara untuk menghaluskan dan melembutkan kulit adalah dengan menggunakan air cucian beras. Efek menghaluskan dan melembutkan kulit dari air cucian beras ini mungkin disebabkan oleh adanya vitamin B₃ yang terekstraksi dari beras ke dalam air. Selain itu, jika ditinjau dari sisi berasnya, berkurangnya kandungan vitamin B₃ dalam beras akibat terekstraksinya vitamin ini sewaktu proses pencucian beras mengakibatkan berkurangnya pula jumlah vitamin B₃ yang dikonsumsi. Hal ini bisa mengakibatkan defisiensi vitamin tersebut pada masyarakat yang menjadikan beras sebagai makanan pokoknya. Mengingat hal diatas, maka analisa mengenai kadar vitamin B₃ yang terdapat dalam beras dan air cuciannya menjadi menarik untuk dilakukan.

Metode kromatografi gas merupakan salah satu teknik analisa modern yang terpenting, karena memberikan sensitivitas dan resolusi yang tinggi, sehingga bisa digunakan untuk menetapkan kadar vitamin B₃ yang sangat kecil di dalam beras dan air cuciannya. Pengembangan metode analisis penetapan kadar vitamin B₃ di dalam beras dan air cuciannya dapat dilakukan dengan kromatografi gas karena vitamin ini memiliki gugus amida, titik lebur yang rendah yakni 128–131°C dan larut dalam pelarut organik. Dan karena kelarutannya dalam pelarut

organik maka vitamin B₃ bisa ditarik dari sampel dengan melakukan ekstraksi dengan pelarut organik yang dapat mengekstraksi vitamin B₃ secara maksimal. Validasi metode kromatografi gas untuk analisis vitamin B₃ perlu dilakukan terlebih dahulu dengan beberapa parameter analisis, mengingat belum ada data validasi metode ini untuk matriks sampel beras dan air cucianya.

3.2. Bagan Kerangka Konseptual



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik.

4.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Multi Purpose I Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Februari sampai Juli 2004.

4.3. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Beras putih dan beras merah (Delanggu)
2. Vitamin B₃ p.a (Sigma-Aldrich)
3. Etil asetat p.a (E. Merck)
4. Air suling

4.4. Instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Timbangan Analitik
2. Vortex
3. Kromatograf gas Agilent seri 6890 dengan detektor FID dan software Hp Chem. Station

4. GC-MSD Hewlet Packard dengan GC 5890 series II Plus dan Mass Selective Detector seri 5972

4.5. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk menetapkan kadar vitamin B₃ dalam beras dan air cucian beras. Metode yang digunakan untuk menetapkan kadar vitamin B₃ dalam beras dan air cuciannya adalah metode kromatografi gas. Sebelum dilakukan penetapan kadar terlebih dahulu dilakukan optimasi kondisi kromatografi gas yang optimal untuk melakukan analisis baik kualitatif maupun kuantitatif. Langkah selanjutnya adalah optimasi terhadap ekstraksi sampel meliputi pemilihan pelarut pengestraksi dan berapa kali pengulangan ekstraksi yang efektif. Setelah itu dilakukan validasi terhadap metode yang digunakan. Parameter analisis untuk validasi metode meliputi selektifitas, limit deteksi, limit kuantitasi, akurasi, dan presisi.

Sampel beras yang digunakan adalah 2 macam beras yakni beras putih dan beras merah yang diambil secara random di daerah Delanggu, Klaten, Jawa Tengah. Kedua macam beras yang telah dihaluskan masing-masing diambil 100,0 gram dan dilakukan preparasi sampel sebelum dilakukan analisis vitamin B₃ dengan kromatografi gas. Sedangkan kadar vitamin B₃ pada air cucian beras ditentukan dengan mencuci 100,0 gram beras sebanyak tiga kali, masing-masing dengan 100 mL air. Kadar vitamin B₃ di dalam beras dan air cuciannya dihitung dengan membandingkan antara area sampel dengan area standar. Selanjutnya dibuat kurva hubungan antara kadar vitamin B₃ dengan pencucian beras.

4.6. Tahap penelitian

4.6.1. Optimasi Kondisi Kromatografi Gas

Untuk penelitian ini digunakan kromatograf gas Agilent 6890 series dengan kolom kapiler HP-5 (5% Phenyl Methyl Siloxane) dengan panjang 30 meter, diameter dalam 0,32 mm, tebal film 0,25 μm . Detektornya adalah *flame ionization detector* (FID) dengan gas pembawa adalah Helium (He).

Optimasi kondisi dilakukan dengan mengatur suhu inlet, detektor, oven, dan aliran gas pembawa. Caranya yaitu larutan standar vitamin B₃ disuntikkan sebanyak 1 μL ke dalam kromatograf gas pada berbagai kondisi.

4.6.2. Optimasi Ekstraksi

4.6.2.1. Pemilihan Pelarut Pengekstraksi

Pelarut pengekstraksi yang dicobakan adalah kloroform dan etil asetat. Dibuat larutan standar vitamin B₃ dalam air dengan konsentrasi 1 mg/mL dan dipipet 5,0 mL, kemudian ditambah 5,0 mL pelarut pengekstraksi. Campuran dikocok dengan vortex selama 3 menit, kemudian fase pelarut pengekstraksi pada bagian atas campuran dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL dan ditambah pelarut pengekstraksi hingga tanda. Masing-masing larutan disuntikkan ke dalam kromatograf gas. Dari kromatogram yang dihasilkan, maka pelarut yang terpilih adalah yang mampu mengekstraksi vitamin B₃ paling besar.

4.6.2.2. Penentuan Pengulangan Ekstraksi yang Optimum Untuk Menarik Vitamin B₃ dari Larutan

Larutan vitamin B₃ standar pada butir 4.6.2.1 dipipet 5,0 mL dan diekstraksi dengan 5,0 mL pelarut pengekstraksi selama 3 menit, kemudian fase

pelarut pengekstraksinya dipisahkan. Fase air yang tersisa diekstraksi lagi dengan cara yang sama hingga ekstraksi kelima, masing-masing secara terpisah ditampung dalam labu ukur 10,0 mL, kemudian ditambah pelarut pengekstraksi hingga tanda. Masing-masing larutan disuntikkan ke dalam kromatograf gas dan diamati area vitamin B₃ yang terekstraksi. Pengulangan ekstraksi yang dipilih adalah pengulangan yang hingga ekstraksi ke-n masih menghasilkan kadar vitamin B₃ yang cukup besar dan pada penjumlahan dengan ekstraksi sebelumnya, kadar vitamin B₃ total yang dihasilkan memenuhi rentang *recovery* 80 –120% dari kadar vitamin B₃ semula.

4.6.3. Uji Kualitatif Vitamin B₃ dalam Sampel

4.6.3.1. Perbandingan Waktu Tambat Analit Dalam Sampel Dengan Standar Vitamin B₃

Dibuat larutan standar vitamin B₃ dalam pelarut terpilih kemudian disuntikkan ke dalam kromatograf gas sebanyak 1,0 µL dan diamati waktu tambatnya. Sampel dipreparasi, hasilnya disuntikkan ke dalam kromatograf gas. Dari kromatogram yang diperoleh, diamati waktu tambatnya dan dibandingkan dengan waktu tambat standar.

4.6.3.2. Metode Adisi Standar Vitamin B₃ terhadap Sampel

Diambil 1 mL larutan sampel yang telah dipreparasi dan ditambah beberapa tetes larutan standar vitamin B₃, kemudian disuntikkan ke dalam kromatograf gas. Kromatogram yang dihasilkan diamati areanya dan dibandingkan dengan kromatogram sampel sebelum diadisi pada butir 4.6.3.1.

Apabila area puncak analit bertambah pada t_R yang sama, berarti analit adalah vitamin B₃.

4.6.3.3. Uji Kualitatif Vitamin B₃ dengan GC-MSD

Untuk uji ini digunakan kromatograf gas Hewlet Packard 5890 seri II dengan detektor Mass Selective Detector seri 5972. Kolom yang digunakan adalah HP-1 dengan panjang 25 meter, diameter 0,32 mm, temperatur oven diprogram 110°C selama 1,5 menit lalu dinaikkan 10°C/menit hingga 176°C selama 2 menit dan akhirnya dinaikkan 20°C/menit sampai 250°C selama 5 menit. Larutan sampel yang telah dipreparasi, diinjeksikan ke dalam kromatograf gas, dan diamati Total Ion Chromatogram (TIC) terhadap massa ion bermuatan satu dan kelimpahan relatif. Dilakukan identifikasi dengan menggunakan pustaka pada database NBS75K.

4.6.4. Validasi Metode

4.6.4.1. Selektifitas

Sampel yang telah dipreparasi, disuntikkan ke dalam kromatograf gas. Dari kromatogram yang diperoleh, dihitung harga Rs antara puncak vitamin B₃ dengan puncak-puncak komponen lain dalam sampel.

4.6.4.2. Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi

Penentuan limit deteksi dan kuantitasi ditentukan dengan membuat beberapa macam konsentrasi larutan vitamin B₃. Ditimbang dengan teliti sebanyak 125 mg vitamin B₃ dan dilarutkan dengan etil asetat di dalam labu ukur 50 ml dan di tambah etil asetat hingga tanda, sehingga diperoleh konsentrasi 125

mg/ 50 mL (= 2,5 mg/mL). Dipipet dengan teliti 1 mL larutan standar vitamin B₃ (2,5 mg/mL) lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan diencerkan dengan etil asetat hingga tanda (konsentrasi 0,1 mg/mL). Dipipet dengan teliti 0,5; 1, 2, 3, 4 dan 5 mL larutan standar vitamin B₃ (0,1 mg/mL), masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL yang berbeda, dan diencerkan dengan etil asetat hingga tanda. Konsentrasi larutan tersebut berturut-turut adalah 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 dan 0,05 mg/mL. Diambil 1,0 µL dan diinjeksikan ke dalam kromatograf. Diamati peaknya dan ditentukan limit deteksi dan limit kuantitasnya..

4.6.4.3. Linieritas

Dipipet dengan teliti 5 mL larutan standar vitamin B₃ (2,5 mg/mL), lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan diencerkan dengan etil asetat hingga tanda (konsentrasi 0,5 mg/mL). Larutan standar vitamin B₃ (0,5 mg/mL) dipipet dengan teliti 0,5; 1; 2; 3 dan 4 mL, masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL yang berbeda dan diencerkan dengan etil asetat hingga tanda, sehingga akan diperoleh seri konsentrasi 0,01; 0,02; 0,04; 0,06 dan 0,08 mg/mL. Dipipet juga dengan teliti 2, 3 dan 4 mL larutan standar vitamin B₃ (0,5 mg/mL), masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL yang berbeda dan diencerkan dengan etil asetat hingga tanda, sehingga akan diperoleh seri konsentrasi larutan baku berikutnya berturut-turut adalah 0,1; 0,15 dan 0,2 mg/mL. Diambil 1,0 µL dari masing-masing konsentrasi larutan baku dan diinjeksikan ke dalam kromatograf gas dan diamati areanya. Selanjutnya dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi vitamin B₃ standar (x) dengan area puncak vitamin B₃ standar

(y), kemudian dihitung persamaan regresi dan koefisien korelasinya (r). Bila harga r hitung lebih besar dari r tabel maka ada korelasi antara area dan konsentrasi.

4.6.4.4. Akurasi

Penentuan akurasi dilakukan dengan menggunakan metode adisi. Caranya yaitu ditimbang 100 g beras yang telah dihaluskan sebanyak 4 kali, dan ditambahkan larutan standar vitamin B₃ (konsentrasi 2,0 mg/mL) berturut-turut 0; 1; 2; dan 3 mL, selanjutnya diperlakukan sesuai prosedur preparasi sampel. Diinjeksikan ke kromatograf gas sebanyak 1 µL, kemudian amati luas areanya. Kadar vitamin B₃ dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh. Masing-masing konsentrasi larutan dilakukan replikasi 3 kali.

Harga *persen recovery* dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ recovery} = \frac{C_s - C_b}{W} \times 100\%$$

Dimana C_s = kadar vitamin B₃ pada sampel yang diadisi
 C_b = kadar vitamin B₃ pada blanko
 W = kadar vitamin B₃ yang ditambahkan mula-mula

Akurasi dianggap baik untuk sampel biologis bila harga % *recovery* dalam rentang 80-120% (Indrayanto, G., 1994).

4.6.4.5. Presisi

4.6.4.5.1. Presisi Alat

Presisi alat dilakukan dengan menyuntikkan salah satu larutan baku vitamin B₃ sebanyak 10 kali. Kemudian dari kromatogram yang dihasilkan, dihitung koefisien variasi (KV) dari area vitamin B₃.

4.6.4.5.2. Presisi Metode

Presisi metode dilakukan dengan menghitung koefisien variasi (KV) dari kromatogram yang dihasilkan pada tahap akurasi. Presisi dianggap baik jika harga $KV \leq 10\%$ (Indrayanto, G., 1994)

4.6.5. Pengambilan Sampel

Dua jenis beras yakni beras putih (poles) dan beras merah diambil secara random dari daerah Delanggu, Klaten, Jawa Tengah pada tanggal 13 Maret 2004.

4.6.6. Preparasi Sampel

Beras dihaluskan dengan mortir dan stamper, diayak dan ditimbang 100,0 gram. Ditambahkan air suling 100 mL, kemudian diaduk sampai homogen, disaring dan cairan dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambah air suling hingga tanda. Lalu dipipet 10,0 mL dan ditambah etil asetat sebanyak 8 mL dan divortex selama 3 menit. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali masing-masing dengan etil asetat 8 mL. Fase etilasetat dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambah etil asetat hingga tanda. Kemudian diuapkan sampai kering, dan dilarutkan dengan 5,0 mL etilasetat, vortex selama 3 menit, kemudian cairan disaring dan dimasukkan ke dalam vial.

4.6.7. Penetapan Kadar Vitamin B₃ pada Beras

Dilakukan preparasi sampel. Larutan sampel diinjeksikan dalam kromatograf gas pada kondisi optimum sebanyak 1 μ L, kemudian rekam

kromatogramnya. Ditentukan kadar vitamin B₃ dalam sampel dengan menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh.

4.6.8. Penetapan Kadar Vitamin B₃ pada Air Cucian Beras

Ditimbang sebanyak 100,0 gram beras dan dicuci tiga kali dengan air 100 mL untuk setiap pencucian, masing-masing air cucian dimasukkan dalam wadah yang berbeda, lalu dilakukan proses seperti preparasi sampel mulai dari disaring dan cairan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan seterusnya. Sampel diinjeksikan dalam kromatograf gas pada kondisi tertentu sebanyak 1 μ L, kemudian rekam kromatogramnya. Ditentukan kadar vitamin B₃ dalam sampel dengan menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh. Dibuat kurva hubungan antara pencucian beras dengan kadar vitamin B₃.

BAB V

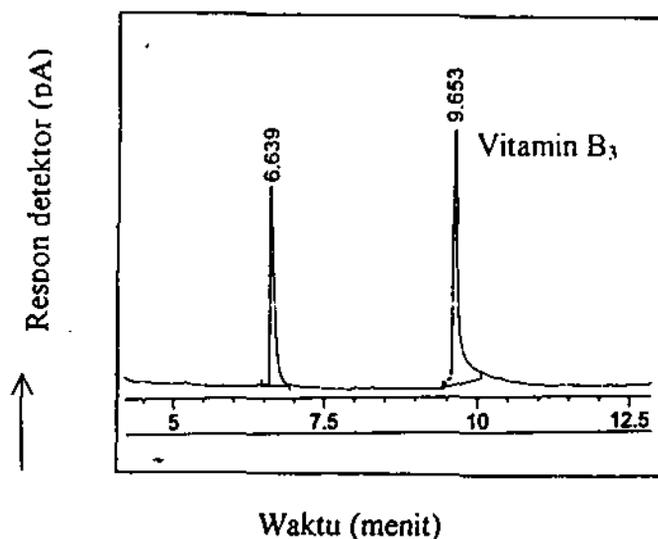
HASIL PENELITIAN

5.1. Optimasi Kondisi Kromatografi Gas

Hasil optimasi kondisi kromatografi gas yaitu temperatur awal 110°C selama 1,5 menit dengan kenaikan tempertur 8 °C/menit hingga mencapai temperatur 176 °C yang dipertahankan selama 2 menit dan dinaikkan lagi dengan kenaikan 20 °C hingga mencapai temperatur akhir 250 °C, serta temperatur inlet sebesar 280 °C. Dari kromatogram,diperoleh t_R vitamin B₃ adalah 9,653 menit. Hasil selengkapnya dapat dilihat dalam tabel 5.1 dan gambar 5.1.

Tabel 5.1. Hasil Optimasi Kondisi Kromatografi Gas

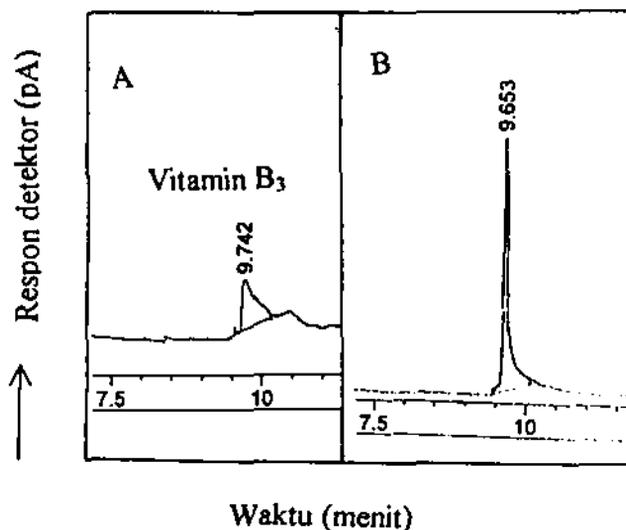
No	Kondisi	Keterangan
1.	Temperatur inlet	280°C
2.	Tempertur detektor	300 °C
3.	Temperatur oven	110°C (1,5 ') $\xrightarrow{8\text{ °C/menit}}$ 176°C (2') $\xrightarrow{20\text{ °C/menit}}$ 250 °C
4.	Laju aliran gas Helium	1 mL/menit
5.	Split rasio	1:2

Gambar 5.1. Kromatogram larutan standar vitamin B₃ dalam etil aasetat (t_R vitamin B₃ = 9,653 menit)

5.2. Optimasi Ekstraksi

5.2.1. Pemilihan Pelarut Pengekstraksi

Hasil pengamatan jumlah vitamin B₃ yang terekstraksi oleh pelarut kloroform dan etil asetat dapat dilihat pada gambar 5.2 dan tabel 5.2.



Gambar 5.2. Kromatogram hasil ekstraksi larutan vitamin B₃ dengan kloroform (A) dan etil asetat (B). t_R vitamin B₃ (menit) = 9,742 (A); 9,653 (B)

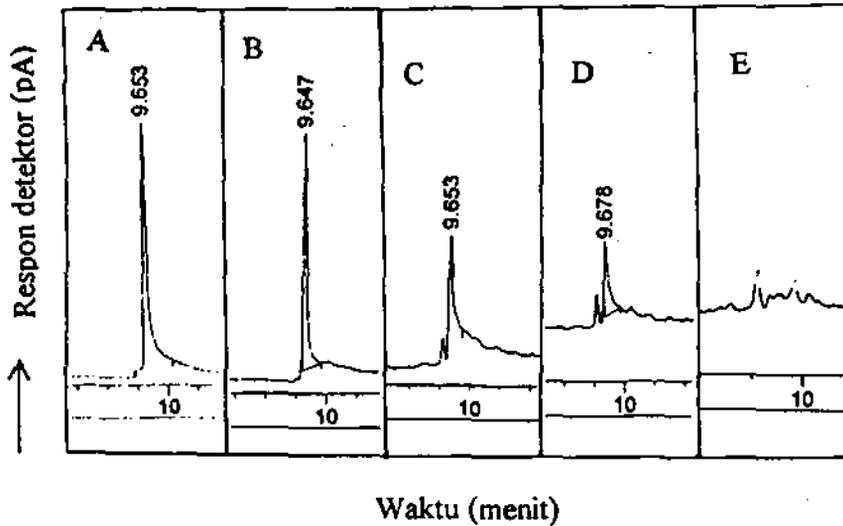
Tabel 5.2. Area vitamin B₃ yang terdeteksi setelah ekstraksi dengan kloroform dan etil asetat

Vitamin B ₃ yang terekstraksi dengan	Waktu tambat (t_R) (menit)	Area
Kloroform	9,742	47, 25743
Etil asetat	9,653	285, 58069

Dari gambar 5.2 dan tabel 5.2, area vitamin B₃ yang diekstraksi dengan etil asetat lebih besar dibanding area vitamin B₃ yang diekstraksi dengan kloroform, ini berarti kemampuan etil asetat untuk mengekstraksi vitamin B₃ lebih besar dibanding kloroform. Pada tahap selanjutnya digunakan etil asetat sebagai pelarut terpilih.

5.2.2. Penentuan Pengulangan Ekstraksi yang Optimum untuk Menarik Vitamin B₃ dari Larutan

Hasil ekstraksi vitamin B₃ dari larutan vitamin B₃ 1,0 mg/mL secara berulang-ulang dapat dilihat pada gambar 5.3 dan tabel 5.3.



Gambar 5.3. Kromatogram vitamin B₃ hasil ekstraksi dari larutan vitamin B₃ 1,0 mg/mL pada ekstraksi ke 1 (A), 2(B), 3(C), 4(D) dan ke 5 (E). t_R vitamin B₃ (menit) = 9,653 (A); 9,647 (B); 9,653 (C); 9,678 (D).

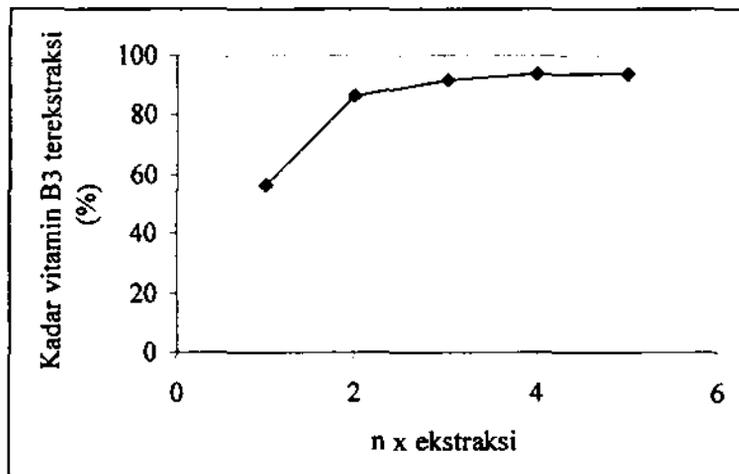
Tabel 5.3. Kadar vitamin B₃ yang terekstraksi dari larutan vitamin B₃ 1,0 mg/mL dalam air pada ekstraksi ke-n

Ekstraksi ke-	Kadar larutan (mg/mL)	% terekstraksi dari kadar sebenarnya
1	0,57	56,23
2	0,31	30,43
3	0,05	5,33
4	0,02	1,92
5	-	-
Total	0,95	93,91

Dari hasil pada tabel 5.3, maka dapat dihitung jumlah vitamin B₃ yang terekstraksi apabila dilakukan n x ekstraksi yang dapat dilihat pada tabel 5.4. dan gambar 5.4.

Tabel 5.4. Kadar vitamin B₃ yang terekstraksi pada n x ekstraksi terhadap larutan vitamin B₃ 1,0 mg/mL

n x ekstraksi	% vitamin B ₃ terekstraksi
1 x	56,23
2 x	86,66
3 x	91,99
4 x	93,91
5 x	93,91



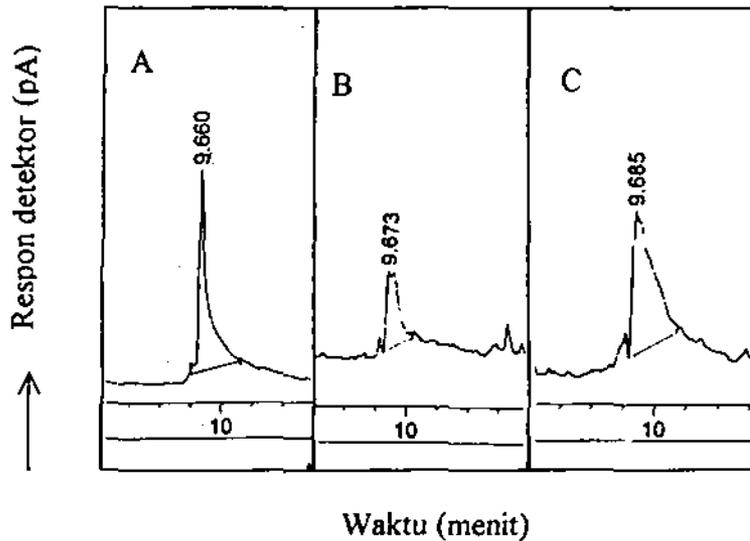
Gambar 5.4. Profil kadar vitamin B₃ yang terekstraksi pada n x ekstraksi dari larutan vitamin B₃ 1 mg/mL

Dari tabel 5.4 dan gambar 5.4 maka pengulangan ekstraksi yang dipilih adalah 3 x karena pada ekstraksi ketiga, % recovery telah berada dalam rentang 80-120% dan pada ekstraksi keempat sudah tidak menghasilkan kadar yang cukup besar.

5.3. Uji Kualitatif Vitamin B₃ dalam Sampel

5.3.1. Perbandingan Waktu Tambat Analit Dalam Sampel Dengan Standar Vitamin B₃

Hasil penyuntikan standar vitamin B₃ dalam etil asetat dan hasil ekstraksi sampel dengan etil asetat dapat dilihat pada gambar 5.5.



Gambar 5.5. Kromatogram larutan standar vitamin B₃ dalam etil asetat (A), larutan sampel sebelum diadisi (B) dan setelah diadisi dengan larutan standar vitamin B₃ (C). t_R vitamin B₃ (menit) = 9,660 (A); 9,673 (B); 9,685 (C)

Dari kromatogram tersebut, dapat dilihat bahwa waktu tambat analit ($t_R = 9,673$) hampir sama dengan waktu tambat vitamin B₃ standar ($t_R = 9,660$).

5.3.2. Metode Adisi Larutan Standar Vitamin B₃ terhadap Sampel

Hasil penyuntikan larutan sampel pada butir 5.3.1 yang telah diadisi dengan larutan standar vitamin B₃ dapat dilihat pada gambar 5.4 dan tabel 5.5.

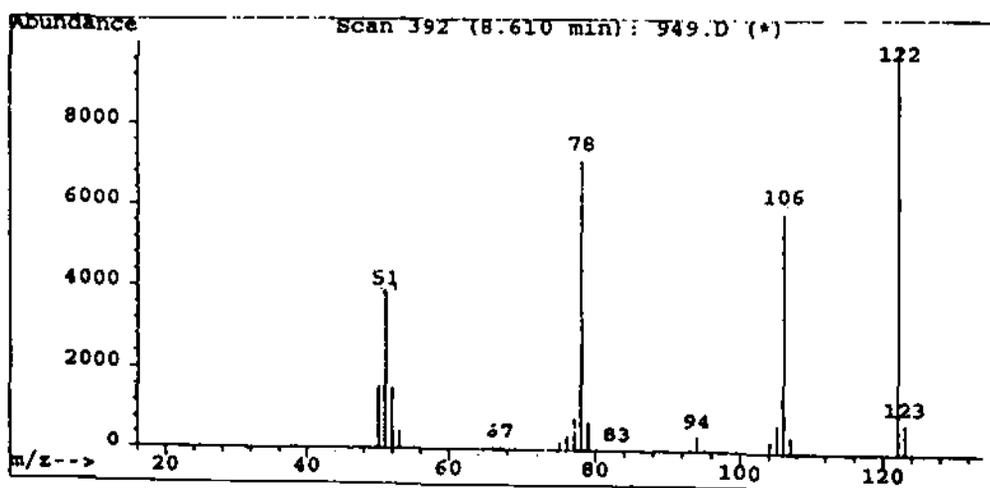
Tabel 5.5. Data penambahan area vitamin B₃ sampel dengan penambahan larutan vitamin B₃ standar

Vitamin B ₃	Waktu tambat (t _R)	Luas area
Sampel	9,673	40,87032
Sampel + standar vitamin B ₃	9,685	148,22412

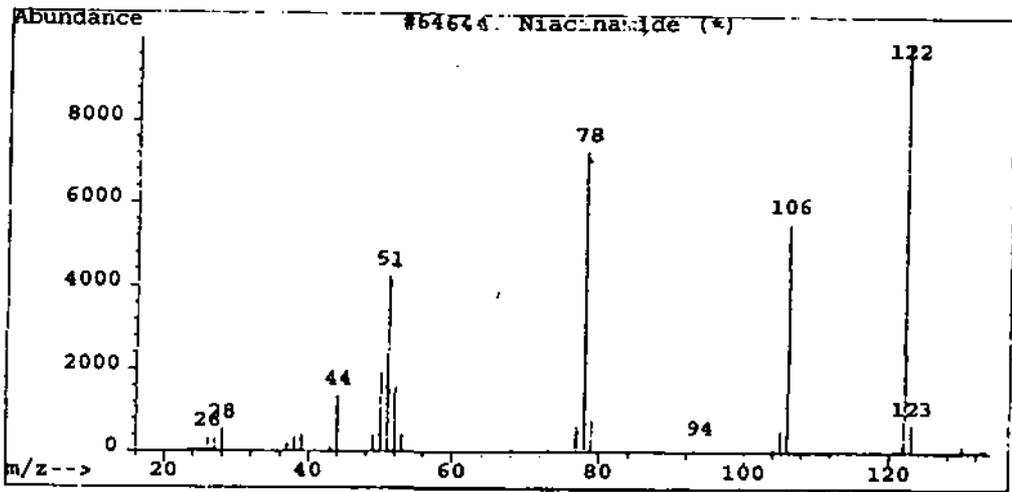
Berdasarkan gambar 5.5 dan tabel 5.5, maka dapat diidentifikasi bahwa analit dalam sampel adalah vitamin B₃.

5.3.3. Uji Kualitatif Vitamin B₃ dengan GC-MSD

Hasil spektrum massa vitamin B₃ dari penyuntikan sampel pada GC-MSD dapat dilihat pada gambar 5.6 dan diidentifikasi dengan menggunakan spektrum massa vitamin B₃ pada pustaka database NBS75K terlihat pada gambar 5.7.



Gambar 5.6. Spektrum massa vitamin B₃ dari sampel



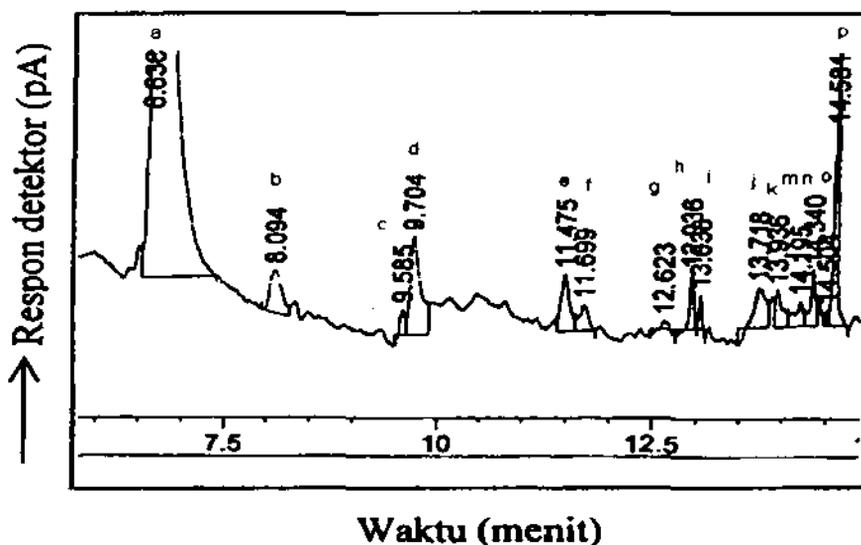
Gambar 5.7. Spektrum massa vitamin B₃ pada pustaka database NBS75K

Berdasarkan gambar 5.5 dan 5.6, puncak dasar analit pada sampel adalah sama dengan vitamin B₃ pada pustaka yakni $m/z = 122$ dan hasil fragmentasi molekul analit pada sampel yang dinyatakan dengan m/z berturut-turut adalah: 51, 67, 78, 94, 106, 122, 123, sedangkan fragmentasi molekul vitamin B₃ dari pustaka adalah 26, 28, 44, 51, 78, 94, 106, 122, 123. Karena adanya kesamaan spektrum massa analit sampel dengan spektrum massa vitamin B₃ pada pustaka, maka dapat disimpulkan bahwa analit sampel tersebut adalah vitamin B₃.

5.4. Validasi Metode

5.4.1. Selektifitas

Hasil penyuntikan larutan sampel serta harga Rs puncak vitamin B₃ dan komponen lain dalam sampel dapat dilihat pada gambar 5.8.

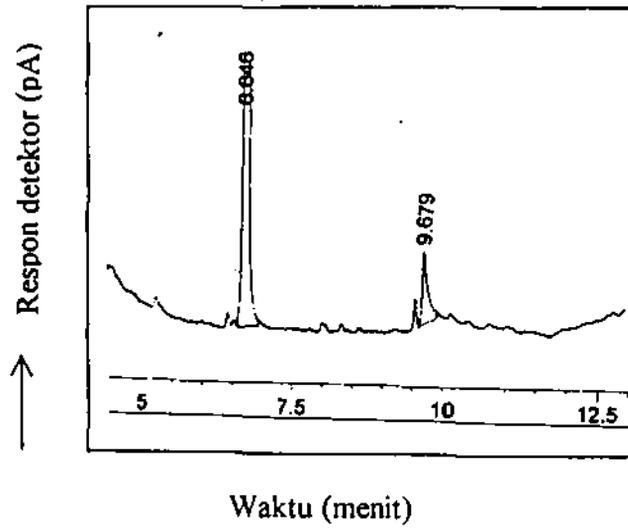


Gambar 5.8. Kromatogram sampel dengan puncak vitamin B₃ (d) dan komponen lain dalam sampel (a, b, c, e, f, g, h, i, j, k, m, n, o, p), serta harga Rs puncak vitamin B₃ ($t_R = 9,704$) dengan puncak komponen c ($t_R = 9,585$) adalah 1,29 dan harga α adalah 1,01

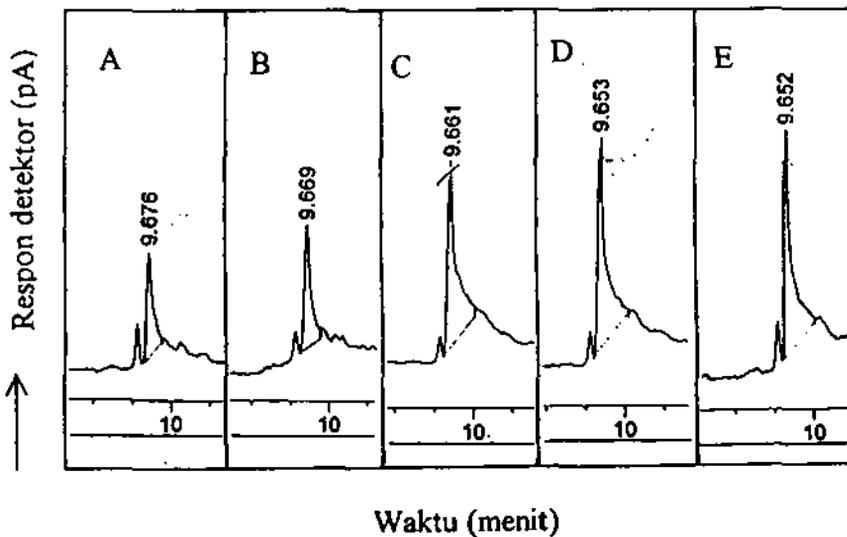
Berdasarkan gambar 5.8 dan harga resolusinya, maka dapat diketahui bahwa metode bersifat selektif karena mampu memisahkan puncak vitamin B₃ dan puncak komponen-komponen lain dengan harga $\alpha > 1$ dan resolusi (R_s) > 1 .

5.4.2. Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi

Hasil penyuntikan larutan vitamin B₃ standar dengan konsentrasi 0,005 mg/mL dapat dilihat pada gambar 5.9. Dari kromatogram gambar 5.9 dapat diukur puncak tertinggi dan terendah dari derau garis dasar (N_p-p) = 0,48639 pA, sehingga dapat dihitung harga $S_b = 0,09729$.



Gambar 5.9. Kromatogram untuk penentuan tinggi derau garis dasar dan harga standar blank signal



Gambar 5.10. Kromatogram pada penentuan limit deteksi dan limit kuantitasi, dengan kadar (mg/mL) 0,01 (A), 0,02 (B), 0,03 (C), 0,04 (D) dan 0,05 (E). t_R vitamin B₃ (menit) = 9,676 (A); 9,669 (B); 9,661 (C); 9,653 (D); 9,652 (E).

Dari kromatogram larutan-larutan standar vitamin B₃ untuk penentuan limit deteksi dan limit kuantitasi pada gambar 5.10, dapat dihitung harga sensitifitas slope (SI) berdasarkan antara kadar dan tinggi puncak seperti yang terlihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.6. Kadar dan tinggi puncak pada penentuan limit deteksi dan limit kuantitasi

Kadar (mg/mL)	Tinggi (pA)
0,010096	2,22420
0,020192	3,65397
0,030288	4,66167
0,040384	5,60190
0,050480	6,61650
Persamaan garis: $y = 106,30477 x + 1,33189$ r hitung = 0,99642	

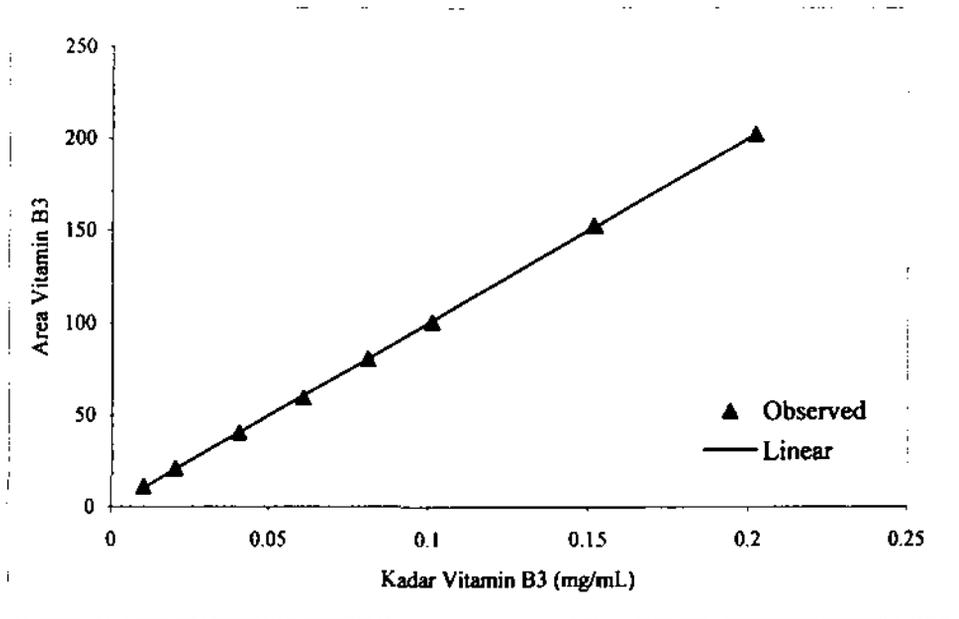
Dari kromatogram gambar 5.9 dan tabel 5.6 didapat harga $S_b = 0,09729$ dan harga $S_I = 106,30477$, maka limit deteksi yang diperoleh adalah: $3 S_b/S_I = 0,002746$ mg/mL dan limit kuantitasnya adalah: $10 S_b/S_I = 0,009153$ mg/mL.

5.4.3. Linieritas

Hasil pengamatan area puncak vitamin B₃ dari delapan macam kadar vitamin B₃ dapat dilihat pada tabel 5.7 dan gambar 5.11.

Tabel 5.7. Hubungan antara kadar vitamin B₃ dengan area vitamin B₃

Kadar vitamin B ₃ (mg/mL)	Area vitamin B ₃
0,010096	11,89327
0,020192	21,60001
0,040384	41,21193
0,060576	60,24408
0,080768	81,33273
0,100960	100,78658
0,151440	152,59276
0,201920	202,40938



Gambar 5.11. Kurva baku kadar vitamin B₃ (mg/mL) vs area vitamin B₃

Dari tabel 5.7, diperoleh persamaan regresi $y = 996,21692x + 1,03194$ dengan harga $r = 0,99994$ dan $V_{xo} = 1,12582\%$. Berdasarkan nilai r_{hitung} yang lebih besar dari harga r_{tabel} ($r_{tabel} = 0,666$ untuk $\alpha = 0,05$ dan $db = n-1$) dan $V_{xo} < 2\%$, berarti ada hubungan yang linier antara kadar vitamin B₃ dengan area vitamin B₃ seperti terlihat pada gambar 5.11.

5.4.4. Akurasi

Untuk penentuan akurasi (% recovery), maka dilakukan penambahan larutan vitamin B₃ standar ke dalam matrik sampel dengan 3 macam konsentrasi secara metode adisi dan diperoleh data seperti pada tabel 5.8. Dari tabel tersebut, dapat dilihat bahwa akurasi metode cukup baik dengan harga % recovery $> 80\%$ sehingga memenuhi persyaratan untuk sampel biologis sebesar 80-120%.

Tabel 5.8. Persen perolehan kembali (% recovery) vitamin B₃ yang ditambahkan dalam matrik sampel

Sampel	Vitamin B ₃ yang ditambahkan (%b/b) x 10 ⁻³	Vitamin B ₃ yang terdeteksi (%b/b) x 10 ⁻³	Vitamin B ₃ yang diperoleh (%b/b) x 10 ⁻³	Recovery (%)	Rata-rata
Blangko A	0	2,10			
Blangko B		2,08			
Blangko C		2,21			
Rata-rata		2,13			
1A	1,99	3,83	1,70	85,43	83,83
1B	1,98	3,64	1,51	76,26	
1C	1,96	3,89	1,76	89,79	
2A	3,96	5,92	3,79	95,71	93,37
2B	3,91	5,85	3,72	95,15	
2C	3,91	5,62	3,49	89,26	
3A	5,93	7,26	5,13	86,51	88,06
3B	5,87	7,60	5,47	93,19	
3C	5,87	7,09	4,96	84,49	

5.4.5. Presisi

5.4.5.1. Presisi Alat

Hasil uji presisi terhadap penyuntikan secara manual ke dalam kromatograf gas dapat dilihat pada tabel 5.9.

Tabel 5.9. Harga presisi penyuntikan manual larutan standar vitamin B₃

No	Area vitamin B ₃
1	153,62540
2	150,81516
3	148,31239
4	156,55931
5	151,34317
6	150,46280
7	155,06996
8	152,59276
9	148,22412
10	153,78012
X = 152,07897 SD = 2,75623 KV = 1,81%	

Berdasarkan tabel 5.9, maka presisi alat menunjukkan nilai $KV = 1,81\%$ sehingga memenuhi syarat presisi ($KV < 2\%$).

5.4.5.2. Presisi Metode

Presisi metode dilakukan bersamaan dengan penentuan akurasi yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.10.

Tabel 5.10. Harga presisi metode pada analisis kadar vitamin B₃ dalam sampel

Sampel	Recovery (%)
1A	85,43
1B	76,26
1C	89,79
2A	95,71
2B	95,15
2C	89,26
3A	86,51
3B	93,19
3C	84,49
Rata-rata recovery (\bar{x}) = 88,42 %	
Standar deviasi (SD) = 6,12	
Koefisien variasi (KV) = 6,92 %	

Dari tabel 5.10, dapat dilihat bahwa presisi metode memiliki harga $KV = 6,92\%$ sehingga memenuhi persyaratan untuk sampel biologis yaitu $< 10\%$.

5.5. Analisis Kuantitatif Vitamin B₃ dalam Sampel

5.5.1. Penetapan Kadar Vitamin B₃ dalam Beras

Hasil analisis kadar vitamin B₃ dalam beras putih dan beras merah dapat dilihat pada tabel 5.11.

Tabel 5.11. Kadar vitamin B₃ dalam beras putih dan beras merah

Sampel	Replikasi	Kadar (%b/b) $\times 10^{-3}$	Kadar rata-rata (%b/b) $\times 10^{-3}$
Beras putih	1	1,70	1,85 \pm 0,16
	2	2,02	
	3	1,82	
Beras merah	1	3,45	3,51 \pm 0,20
	2	3,35	
	3	3,73	

5.5.2. Penetapan Kadar Vitamin B₃ dalam Air Cucian Beras

Hasil analisis kadar vitamin B₃ dalam air cucian beras dapat dilihat pada tabel 5.12.

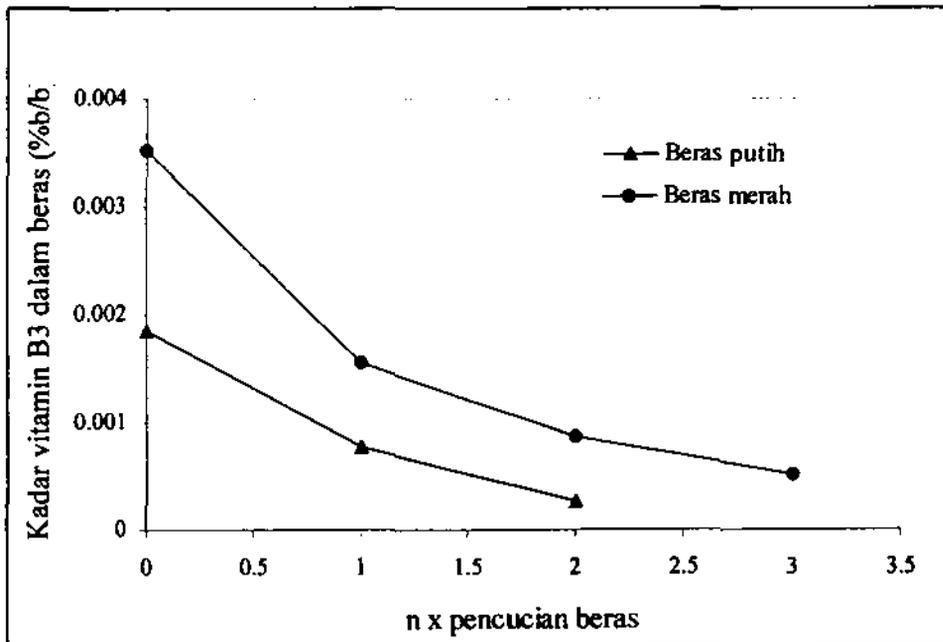
Tabel 5.12. Kadar vitamin B₃ dalam air cucian beras

Beras	n x pencucian	Sampel	Kadar (% b/b) $\times 10^{-3}$	Kadar rata-rata (% b/b) $\times 10^{-3}$
Beras putih	1	A	0,97	1,09 \pm 0,10
		B	1,18	
		C	1,11	
	2	A	0,53	0,49 \pm 0,04
		B	0,50	
		C	0,45	
	3	A	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
		B	Tidak terdeteksi	
		C	Tidak terdeteksi	
Beras merah	1	D	2,09	1,96 \pm 0,11
		E	1,89	
		F	1,90	
	2	D	0,74	0,69 \pm 0,04
		E	0,67	
		F	0,67	
	3	D	0,40	0,36 \pm 0,06
		E	0,29	
		F	0,38	

Kadar vitamin B₃ yang masih tersisa di dalam beras setelah beberapa kali pencucian beras dapat dilihat pada tabel 5.13 dan gambar 5.12.

Tabel 5.13. Kadar vitamin B₃ pada beras setelah n x pencucian beras

Beras	n x pencucian beras	Kadar vitamin B ₃ pada beras (%b/b) $\times 10^{-3}$
Beras putih	0	1,85
	1	0,76
	2	0,27
Beras merah	0	3,51
	1	1,55
	2	0,86
	3	0,50

Gambar 5.12. Profil kadar vitamin B₃ dalam beras terhadap pencucian beras

Dari hasil pada tabel 5.13, maka dapat dihitung jumlah vitamin B₃ dalam beras yang terekstraksi apabila dilakukan n kali pencucian beras yang dapat dilihat pada tabel 5.14

Tabel 5.14. Persentase kadar vitamin B₃ dalam beras yang terekstraksi setelah n kali pencucian beras.

Sampel	n x pencucian beras	% kadar vitamin B ₃ yang terekstraksi
Beras putih	0	0
	1	58,92
	2	85,41
Beras merah	0	0
	1	55,84
	2	75,50
	3	85,75

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk menentukan kadar vitamin B₃ dalam beras dan air cucuannya serta pengaruh pencucian beras terhadap kadar vitamin B₃ di dalam beras dengan metode kromatografi gas. Oleh karena tidak adanya metode standar kromatografi gas untuk penetapan kadar vitamin B₃, maka sebelum dilakukan analisis, terlebih dahulu dilakukan optimasi terhadap metode kromatografi gas yang digunakan, serta pengujian terhadap kesahihan metode dengan melakukan validasi metode.

Tahap pertama adalah melakukan optimasi kondisi kromatografi gas untuk mendapatkan kondisi analisis yang optimal baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Caranya yaitu dengan mengatur suhu inlet, detektor dan oven, serta kecepatan alir gas pembawa hingga dihasilkan kromatogram dengan pemisahan puncak vitamin B₃ dengan komponen lainnya yang sesuai dengan kriteria harga $R_s > 1$. Kondisi kromatograf optimum yang diperoleh adalah temperatur inlet 280°C, temperatur detektor 300°C dan temperatur oven terprogram dengan suhu awal 110°C selama 1,5 menit, dengan kenaikan suhu 8°C/menit hingga mencapai suhu 176°C yang dipertahankan selama 2 menit dan dinaikkan 20°C hingga mencapai suhu akhir 250°C, dan kecepatan gas pembawa adalah 1,0 mL/menit. Pada kondisi tersebut, harga t_R vitamin B₃ adalah 9,653 dan puncak vitamin B₃ dapat terpisah sampai garis dasar dengan komponen lainnya.

Tahap selanjutnya adalah memilih pelarut pengekstraksi terbaik yang memenuhi kriteria. Pelarut yang dicobakan adalah kloroform dan etil asetat. Pada

tahap ini pelarut yang dipilih adalah etil asetat, karena hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa vitamin B₃ yang terekstraksi dengan etil asetat jauh lebih besar dibandingkan ekstraksi dengan kloroform, selain itu ekstraksi dengan kloroform menimbulkan buih yang sukar hilang sehingga menyulitkan dalam proses pemisahan sedangkan ekstraksi dengan etil asetat tidak menimbulkan buih sehingga mudah untuk memisahkannya. Selanjutnya ditentukan berapa kali ekstraksi yang dilakukan untuk menarik vitamin B₃ dari sampel yang optimum. Pada analisis ini dilakukan ekstraksi sebanyak 5 kali terhadap larutan vitamin B₃ 1 mg/mL dalam air, kemudian masing-masing ekstrak disuntikkan kedalam kromatograf gas. Dari hasil yang diperoleh, ternyata dengan 3 kali ekstraksi didapatkan kadar vitamin B₃ yang cukup besar, dan pada penjumlahan secara kumulatif, setelah tiga kali ekstraksi didapatkan kadar recovery sebesar 91,99% sehingga memenuhi syarat % recovery untuk bioanalisis yaitu 80-120% dan dari gambar 5.4 terlihat penambahan kadar yang relatif kecil pada ekstraksi keempat. Oleh karena itu pengulangan ekstraksi yang dipilih adalah sebanyak tiga kali.

Uji kualitatif dilakukan untuk memastikan adanya vitamin B₃ dalam sampel. Untuk uji ini dilakukan penyuntikan ekstrak sampel ke dalam kromatograf gas untuk melihat profil kromatogramnya, kemudian disuntikkan larutan vitamin B₃ standar sebagai pembanding. Dari kromatogram gambar 5.5, didapatkan waktu tambat analit ($t_R = 9,673$) yang mirip dengan waktu tambat vitamin B₃ standar ($t_R = 9,660$). Hal ini menunjukkan bahwa analit dalam sampel kemungkinan besar adalah vitamin B₃. Untuk memperkuat uji kualitatif dilakukan metode adisi vitamin B₃ terhadap ekstrak sampel, kemudian disuntikkan ke kromatograf gas. Pada penyuntikkan ekstrak pertama yaitu sebelum diadisi

larutan vitamin B₃ standar, area vitamin B₃ dalam sampel adalah 40,87032 dengan waktu tambat 9,673 dan setelah diadisi dengan larutan vitamin B₃ standar, area analit dalam sampel menjadi 148,22412 dengan waktu tambat 9,685. dengan adanya penambahan area serta kemiripan waktu tambat dengan larutan vitamin B₃ standar, dapat memperkuat dugaan bahwa analit dalam sampel adalah vitamin B₃. Untuk memastikan bahwa analit dalam sampel adalah vitamin B₃ maka dilakukan analisa kualitatif dengan GC-MS. Berdasarkan gambar 5.6 dan 5.7, puncak dasar analit pada sampel adalah sama dengan vitamin B₃ pada pustaka yakni $m/z = 122$ dan hasil fragmentasi molekul analit pada sampel yang dinyatakan dengan m/z berturut-turut adalah: 51, 67, 78, 94, 106, 122, 123, sedangkan fragmentasi molekul vitamin B₃ dari pustaka adalah 26, 28, 44, 51, 78, 94, 106, 122, 123. Karena adanya kesamaan spektrum massa analit sampel dengan spektrum massa vitamin B₃ pada pustaka, maka dapat disimpulkan bahwa analit sampel tersebut adalah vitamin B₃.

Validasi dilakukan untuk menentukan kesahihan metode. Validasi yang dilakukan meliputi selektifitas, penentuan limit deteksi dan limit kuantitasi, penentuan linieritas, akurasi dan presisi.

Tahap pertama dari uji validasi metode adalah uji selektifitas yaitu kemampuan metode untuk mendeteksi analit secara selektif dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel. Dari profil kromatogram sampel pada gambar 5.8, diperoleh harga $\alpha = 1,01$ dan $R_s = 1,29$ untuk pemisahan puncak vitamin B₃ dan puncak komponen-komponen lain dalam sampel. Hal ini berarti metode bersifat selektif, karena mampu memisahkan vitamin B₃ dan komponen-komponen lain dalam sampel dengan harga $\alpha > 1$ dan $R_s > 1$.

Tahap validasi selanjutnya adalah penentuan limit deteksi dan limit kuantitasi. Hal ini perlu dilakukan untuk penentuan kadar vitamin B₃ yang diperkirakan berkadar rendah pada sampel, yaitu untuk memastikan bahwa kadar vitamin B₃ yang rendah tersebut dapat terdeteksi oleh alat dan dapat dihitung secara kuantitatif. Pada penentuan parameter ini meliputi beberapa tahapan untuk mendapatkan harga limit deteksi dan limit kuantitasi. Kriteria penentuan limit deteksi dan limit kuantitasi adalah harga Sb yang diperoleh dengan menyuntikkan larutan vitamin B₃ standar konsentrasi sangat kecil dan dari kromatogram yang diperoleh akan didapatkan harga puncak pengotor tertinggi (Np) dan puncak pengotor terendah pada daerah 20 kali lebar puncak vitamin B₃. Kemudian kriteria yang kedua adalah harga slope (SI) pada persamaan regresi antara kadar vitamin B₃ standar konsentrasi kecil dengan tinggi puncak. Dari hasil percobaan diperoleh harga Sb = 0,09729 dan harga SI = 106,30477, sehingga limit deteksi yang diperoleh adalah: $3 \text{ Sb/SI} = 0,002746 \text{ mg/mL}$ dan limit kuantitasnya adalah: $10 \text{ Sb/SI} = 0,009153 \text{ mg/mL}$.

Validasi berikutnya adalah pembuatan kurva baku untuk menentukan hubungan linier antara konsentrasi terhadap area. Dari tabel 5.7, diperoleh persamaan regresi $y = 996,21692x + 1,03194$ dengan harga $r = 0,99994$ yang lebih besar dari harga r_{tabel} ($\alpha = 0,05$ dan $db = n-1$) yaitu 0,666, sehingga dapat dinyatakan bahwa ada korelasi linier antara kadar vitamin B₃ dengan area vitamin B₃ dan persamaan garis regresi linier tersebut dapat digunakan untuk menghitung kadar vitamin B₃ dari sampel yang akan ditentukan. Parameter lain yang dapat digunakan untuk menentukan linieritas adalah nilai variasi fungsi (Vxo). Suatu

persamaan garis dinyatakan linier jika $V_{x0} < 2\%$ dan dari uji linieritas didapat nilai $V_{x0} = 1,13\%$.

Penentuan akurasi dilakukan untuk menyatakan hasil pengukuran kadar vitamin B₃ yang diperoleh dengan metode kromatografi gas mendekati kadar vitamin B₃ sebenarnya yang berada dalam sampel. Penentuan akurasi dilakukan dengan menghitung persen perolehan kembali atau % recovery. Penentuan % recovery dilakukan dengan metode adisi, yakni dengan penambahan 3 konsentrasi vitamin B₃ berbeda ke dalam sampel dan pada masing-masing konsentrasi dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Hasil penentuan akurasi, didapatkan tiga harga rata-rata persen perolehan kembali vitamin B₃ yang diadisi dalam sampel, yang dapat dilihat pada tabel 5.8. Dari ketiga harga % recovery yang didapat, nilainya lebih besar dari 80%, sehingga telah memenuhi persyaratan akurasi untuk bioanalisis yaitu 80-120%. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode yang digunakan memiliki akurasi yang baik.

Presisi alat dan metode dilakukan untuk memastikan bahwa hasil perhitungan kadar vitamin B₃ pada sampel memiliki kedekatan hasil analisis pada penetapan berulang kali. Presisi alat dilakukan dengan menginjeksikan larutan vitamin B₃ standar dengan konsentrasi tertentu sebanyak 10 kali, dan didapat harga KV = 1,81% sehingga memenuhi persyaratan validasi yaitu KV harus kurang dari 2%. Penentuan presisi alat dimaksudkan untuk memastikan bahwa pada penyuntikan berulang akan diperoleh hasil yang sama atau mendekati sama. Untuk penentuan presisi metode dilakukan secara bersamaan dengan tahap akurasi dengan metode adisi dan harga KV yang didapat adalah 6,92%, sehingga memenuhi syarat validasi untuk bahan alam yaitu KV kurang dari 10%.

Penentuan presisi metode dimaksudkan untuk memastikan bahwa penggunaan metode kromatografi gas secara berulang akan tetap memberikan hasil yang sama atau mendekati sama.

Berdasarkan hasil uji validasi yang meliputi uji selektifitas, uji limit deteksi dan limit kuantitasi, uji linieritas, uji akurasi dan uji presisi, metode penentuan kadar vitamin B₃ dalam beras secara kromatografi gas memenuhi persyaratan validasi sehingga metode valid untuk penentuan vitamin B₃ dalam beras.

Tahap terakhir dari penelitian ini adalah penetapan kadar vitamin B₃ dalam sampel. Sampel yang digunakan adalah beras putih dan beras merah serta air cucian dari kedua beras tersebut. Sebelumnya terlebih dahulu dilakukan preparasi sampel dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut pengekstraksi. Setelah ekstraksi dengan etil asetat, fase etil asetat dipekatkan lagi untuk mendapatkan kadar vitamin B₃ yang bisa memberikan respon detektor jika disuntikkan ke kromatograf gas, hal ini dilakukan mengingat kecilnya kadar vitamin B₃ yang terkandung didalam sampel. Dari hasil penelitian didapatkan kadar vitamin B₃ pada beras putih sebesar 0,00185 % b/b dan pada beras merah sebesar 0,00351 % b/b, dari data ini terlihat bahwa kandungan vitamin B₃ pada beras merah lebih besar dari pada beras putih. Sedangkan analisis kadar vitamin B₃ pada air cucian kedua beras tersebut diperoleh kadar vitamin B₃ sebesar 0,00109 %b/b dan 0,00049 % b/b berturut-turut untuk air cucian beras pertama dan kedua pada beras putih, sedangkan untuk air cucian pertama, kedua dan ketiga pada beras merah berturut-turut diperoleh kadar 0.00196 % b/b; 0,00069% b/b; dan 0,00036% b/b. Pada air cucian ketiga dari beras putih, hasil preparasi sampel yang disuntikkan

ke kromatograf gas tidak memberikan respon detektor sehingga kadarnya tidak bisa dihitung, hal ini mungkin dikarenakan kadar vitamin B₃ pada air cucian ketiga sangat kecil dan berada dibawah kadar limit deteksi sehingga tidak ada respon detektor. Dari profil kadar vitamin B₃ dalam beras terhadap pencucian beras didapatkan bahwa baik pada beras putih maupun beras merah, terlihat kurva kadar vitamin B₃ terus menurun dengan semakin banyaknya pencucian beras. Hal ini semakin diperjelas dengan melihat tabel 5.14 dimana dengan 2 kali pencucian beras putih maka kadar vitamin B₃ telah terekstraksi sebesar 85,41%, sedangkan pada beras merah dengan tiga kali pencucian maka vitamin B₃ terekstraksi sebesar 85,75%.

BAB VII

PENUTUP

7.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Validasi metode kromatografi gas untuk penetapan kadar vitamin B₃ dalam beras dan air cucianya untuk uji selektifitas diperoleh harga $R_s = 1,29$ dan $\alpha = 1,01$, untuk uji sensitifitas diperoleh nilai limit deteksinya adalah 0,002746 mg/mL dan limit kuantitasnya adalah 0,009153 mg/mL, uji linieritas diperoleh persamaan regresi $y = 996,21692x + 1,03194$ dengan harga $r = 0,99994$ dan $V_{xo} = 1,12582\%$, hasil pengukuran akurasi menunjukkan harga persen recovery 88,42% dan presisi metode diperoleh KV sebesar 6,92%.
2. Kadar vitamin B₃ dalam beras putih adalah sebesar $(1,85 \pm 0,16) \times 10^{-3} \%$ b/b dan pada beras merah sebesar $(3,51 \pm 0,20) \times 10^{-3} \%$ b/b, sedangkan pada air cucian beras putih diperoleh kadar sebesar $(1,09 \pm 0,10) \times 10^{-3} \%$ b/b dan $(0,49 \pm 0,04) \times 10^{-3} \%$ b/b berturut-turut untuk air cucian beras pertama dan kedua, dan untuk air cucian beras ketiga tidak terdeteksi, sedangkan untuk air cucian pertama, kedua dan ketiga pada beras merah berturut-turut diperoleh kadar $(1,96 \pm 0,11) \times 10^{-3} \%$ b/b; $(0,69 \pm 0,04) \times 10^{-3} \%$ b/b; dan $(0,36 \pm 0,06) \times 10^{-3} \%$ b/b.
3. Kadar vitamin B₃ telah terekstraksi sebesar 93,00% dari beras putih dengan tiga kali pencucian beras dan 93,96% vitamin B₃ terekstraksi dari beras merah dengan tiga kali pencucian beras.

7.2. Saran

Adapun saran yang dapat diajukan dari penelitian yang dilakukan adalah:

1. Untuk menetapkan kadar vitamin B₃ pada suatu sampel bisa dilakukan dengan metode kromatografi gas.
2. Dilakukan penelitian dengan metode adisi untuk kadar vitamin B₃ yang rendah dalam sampel air cucian beras putih agar diperoleh data yang lebih lengkap tentang pengaruh pencucian beras terhadap kadar vitamin B₃ di dalam beras.
3. Ditinjau dari pengaruh pencucian beras terhadap pelepasan vitamin B₃ dari beras, disarankan untuk tidak mencuci beras lebih dari satu kali dalam proses memasak nasi.
4. Air cucian beras bisa dimanfaatkan untuk mendapatkan efek menghaluskan dan melembutkan kulit karena mengandung vitamin B₃.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2001, *Kodeks Makanan Indonesia 2001*, Badan Pengawas Obat dan Makanan, Jakarta, hlm 6-10, 196-7
- Anonim, 2002, *The United States Pharmacopeia 25th /The National Formulary 20th*, United States Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, pp 1221-3
- Anonim, 2003, *All About Rice*, www.pechsiam.com/allabout_nutrition.htm
- Belitz, H.D., Grosch, W., 1987, *Food Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, p 513
- Bose, L.K., 2003, Nutritional Value of Rice, *Sai Pran Aam The Monthly Magazine, Year 2 Vol 4*, Feb 2003
- Budavari, S. (Ed), 2001, *The Merck Index*, 13th Ed., Merck & Co, Inc, White Huose Station, NJ, pp 1168-9
- Dexter, P.B., 1998, *Rice Fortification for Developing Countries*, OMNI/USAID, Arlington, VA, pp 1-5
- Elliot, R.B., Chase, H.P., 1991, Prevention or Delay of Type I (Insulin-Dependent) Diabetes Melitus in Children Using Nicotinamide, *Diabetologia* 34: 362-5
- Flodin, N.W., 1988, *Pharmacology of Micronutrients*, Alan R. Liss, Inc., New York, pp 129-38
- Fried, B., Sherma, J., 1994, *Thin Layer Chromatography Techniques and Application*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp 346-7
- Gennaro, A.R. (Ed), 2000, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., Lippincot Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, pp 1808-9
- Gensler, H.L., 1997, Prevention of Photoimmunosuppression and Photocarcinogenesis by Topical Nicotinamide, *Nutr. Cancer* 29 (2): 157-62
- Green, J.M., 1996, A Practical Guide to Analytical Method Validation, *Anal. Chem.* 68: 305A-9A
- Hortwitz, W. (Ed), 2000, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th Ed., AOAC International, Maryland, pp 45.1.10-3, 45.2.04, 50.1.19
- Indrayanto, G., 1994, Metode Validasi Pada Analisis Kimia, *Prosiding Pendidikan Berkelanjutan Apoteker*, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya, hlm 42-50

- Ismail, S.A., Haney, W.G., Abdel-Moety, E.M., 1985, Spectrodensitometric Determination of Nicotinamide in Some Multivitamin Preparations, *Pharmazie* 40: 804-5
- Li, K., 2002, Simultaneous Determination of Nicotinamide, Pyridoxine Hydrochloride, Thiamine Mononitrate and Riboflavin in Multivitamin with Mineral Tablets by Reversed-Phase Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography, *Biomed. Chromatogr.* 16 (8): 504-7
- Lin, H.J., Chen, C.W., Hwang, B.S., Choong, Y.M., 2000, A Rapid and Simple Gas Chromatographic Method for Direct Determination of Nicotinamide in Commercial Vitamins and Tonic Drinks, *J. Food Drug Anal.* 8 (2): 113-23
- Lin, H.J., Wang, M.L., Chen, C.W., Hwang, B.S., Lee, M., Choong, Y.M., 2000, A Gas Chromatographic Method for Determination of Nicotinamide, Paraben Esters and Caffeine in Commercial Health Drinks, Tonic Drinks and Cold Formulas, *J. Food Drug Anal.* 8 (3): 180-6
- Martin, A., 1993, *Physical Pharmacy*, 4th Ed, Lea & Febinger, Philadelphia, pp 237-9
- Mason, P., 2001, *Dietary Supplements*, 2nd Ed, Pharmaceutical Press, London, pp 160-3
- Miller, J.M., Crowther, J.B. (Ed), 2000, *Analytical Chemistry in a GMP Environment*, John Wiley & Sons Inc, New York, pp 217-52, 385-91, 435-53
- Mulja, M., Sugijanto, 1994, *Pekembangan Instrumentasi Kromatograf Gas*, Airlangga University Press, Surabaya, hlm 13-65
- Mulja, M., Suharman, 1995, *Analisis Instrumental*, Airlangga University Press, Surabaya, hlm 149-214, 278-85
- Noonan, P.J., 2003, Skin Science, *USA Weekend Magazine*, June 1, 2003
- Parfitt, K. (Ed), 2002, *Martindale The Complete Drug Reference*, 33rd Ed., Pharmaceutical Press, London, pp 1372-3
- Polo, V., Saibene, A., Pontiroli, A.E., 1998, Nicotinamide Improves Insulin Secretion and Metabolic Control in Lean Type 2 Diabetic Patients with Secondary Failure to Sulphonylureas, *Acta Diabetol.* 35: 61-4
- Pozzili, P., Browne, P.D., Kolb, H., 1996, Meta-Analysis of Nicotinamide Treatment in Patient with Recent Onset Insulin Dependent Diabetes, *Diabetes Care* 19: 1357-63

- Prosser, A.R., Sheppard, A.J., 1968, Gas-Liquid Chromatography of Niacin and Niacinamide, *J. Pharm. Sci.* 57 (6): 1004-6
- Ropte, D., Aieloff, K., 1985, Densitometric Determination of Nicotinamide in Multivitamin Preparation after Thin Layer Chromatographic Separation, *Pharmazie* 40: 793-4
- Shalita, A.r., Smith, J.G., Parish, L.C., Sofman, M.S., Chalker, D.K., 1995, Topical Nicotinamide Compared with Clindamycin Gel in The Treatment of Inflammatory Acne Vulgaris, *Int.J.Dermatol.* 34 (6): 434-7
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 1998, *Principles of Instrumental Analysis*, 5th Ed., Harcourt Brace College Publ., Philadelphia, pp 701-22
- Soedibyo, M., 1998, *Alam Sumber Kesehatan Manfaat dan Kegunaan*, Balai Pustaka, Jakarta, hlm 285-6
- Stein, J., Hahn, A., Rehner G., 1995, High Performance Liquid Chromatographic Determination of Nicotinic Acid and Nicotinamide in Biological Samples Applying Post-Column Derivatization Resulting in Bathochrome Absorption Shifts, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 665 (1): 71-8
- Takatsuki, K., Suzuki, S., Sato, M., Sakai, K., Ushizawa, I., 1987, Liquid Chromatographic Determination of Free and Added Niacin and Niacinamide in Beef and Pork, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 (4): 698-702
- Tanaka, A., Iijima, M., Kikuchi, Y., Hoshino, J., Nose, N., 1989, Gas Chromatographic Determination of Nicotinamide in Meat and Meat Products as 3-cyanopyridine, *J. Chromat.* 466: 307-17
- Valls, F., Sancho, M.T., Fernandez-Muino, M.A., Checa, M.A., 2000, Simultaneous Determination of Nicotinic Acid and Nicotinamide in Cooked Sausages, *J. Agric. Food Chem.* 48 (8): 3392-5
- Vesmann, J., Stronberg, S., 1975, GLC Determination of Nicotinamide in Multivitamin Formulations after Conversion to Nicotinonitrile, *J. Pharm. Sci.* 64 (2): 311-3

LAMPIRAN I**PERHITUNGAN FAKTOR SELEKTIFITAS (α) DAN RESOLUSI (R_s)**

Rumus yang digunakan dalam menghitung harga α dan R_s adalah sebagai berikut:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5(W_2 + W_1)}$$

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Keterangan:

t_{R1} = waktu tambat komponen 1

t_{R2} = waktu tambat komponen 2

W_1 dan W_2 = lebar dasar puncak komponen 1 dan 2

Contoh perhitungan R_s dan α dari vitamin B₃ dan komponen lain pada sampel:

t_{R1} = waktu tambat komponen c = 9,585

t_{R2} = waktu tambat vitamin B₃ = 9,704

W_1 = lebar dasar puncak komponen c = 0,0572

W_2 = lebar dasar puncak vitamin B₃ = 0,1266

Sehingga diperoleh:

$$R_s = \frac{9,740 - 9,585}{0,5(0,0572 + 0,1266)} = 1,29$$

$$\alpha = \frac{9,704}{9,585} = 1,01$$

LAMPIRAN 2

PERHITUNGAN HARGA LIMIT DETEKSI DAN LIMIT KUANTITASI

Rumus:

$$C = k \frac{S_b}{S_l}$$

Dimana: C = kadar pada limit deteksi (LD) dan limit kuantitasi (LK)

K = konstanta untuk LD = 3 dan LK = 10

S_l = sensitifitas slope

S_b = standar deviasi analytical blank signal

Pada perhitungan LD dan LK vitamin B₃ diperoleh persamaan regresi sebagai berikut:

$$y = 106,30477 x + 1,33189$$

Dimana: x = kadar vitamin B₃; y = tinggi puncak kromatogram

S_l = slope persamaan regresi = 106,30477

Sedangkan harga (Np-p) = 0,48639 pA, sehingga dapat dihitung harga

$$S_b = \frac{Np-p}{5} = \frac{0,48639}{5} = 0,09729$$

sehingga:

$$LD = 3 \times \frac{0,09729}{106,30477} = 0,002746 \text{ mg/mL}$$

$$LK = 10 \times \frac{0,09729}{106,30477} = 0,009153 \text{ mg/mL}$$

LAMPIRAN 3
PERHITUNGAN LINIERITAS

Kadar vitamin B ₃ (mg/mL) (X)	Area vitamin B ₃ (Y)	Y'i = a + bXi	(Y'i - Y) ²
0,010096	11,89327	11,08957	0,64565
0,020192	21,60001	21,14755	0,20472
0,040384	41,21193	41,26317	0,00263
0,060576	60,24408	61,37878	1,28754
0,080768	81,33273	81,49439	0,02613
0,100960	100,78658	101,61000	0,57083
0,151440	152,59276	151,89903	0,48126
0,201920	202,40938	202,18806	0,04898

Persamaan regresi: $y = 996,21692x + 1,03194$

$$r = 0,99994$$

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (Y'_i - Y)^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{3,37493}{8 - 2}} = 0,74999$$

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b} = \frac{0,74999}{996,21692} = 0,000753$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{x} \times 100\% = \frac{0,000753}{0,666336} \times 100\% = 1,13\%$$

LAMPIRAN 4

PERHITUNGAN PEROLEHAN KEMBALI (% RECOVERY)

Beras (gram)	Kadar vitamin B ₃ yang ditambahkan (%b/b) x 10 ⁻³	Area	Kadar vitamin B ₃ yang terdeteksi (mg/mL)	Kadar vitamin B ₃ yang terdeteksi (%b/b) x 10 ⁻³	Kadar vitamin B ₃ yang diperoleh (%b/b) x 10 ⁻³	Recovery (%)
100,1512	0	43,03092	0,04219	2,10		
101,7622		43,14056	0,04227	2,08		
101,8703		45,86082	0,04496	2,21		
				$\bar{x} = 2,13$		
101,2945	1,99	78,43435	0,07765	3,83	1,70	85,43
101,4824	1,98	74,73800	0,07396	3,64	1,51	76,26
102,6642	1,96	80,53494	0,07986	3,89	1,76	89,79
101,7048	3,96	120,96311	0,12036	5,92	3,79	95,71
102,9671	3,91	121,14840	0,12057	5,85	3,72	95,15
102,9229	3,91	116,30006	0,11576	5,62	3,49	89,26
101,7804	5,93	148,22412	0,14779	7,26	5,13	86,51
102,8923	5,87	156,92482	0,15648	7,60	5,47	93,19
102,9485	5,87	146,52505	0,14605	7,09	4,96	84,49

Larutan vitamin B₃ standar yang ditambahkan berasal dari 100,6 mg vitamin B₃ yang dilarutkan didalam 50,0 mL air (konsentrasi: 2,012 mg/mL). Pada 100 gram sampel beras ditambahkan berturut-turut 1; 2; dan 3 mL larutan standar, masing-masing dengan 3 kali replikasi.

Contoh perhitungan untuk penambahan 1 mL larutan vitamin B₃ 2,012 mg/mL pada replikasi pertama:

$$\begin{aligned} \text{Vitamin B}_3 \text{ yang ditambahkan} &= 1 \text{ mL larutan vitamin B}_3 \text{ 2,012 mg/mL} \\ &= 2,012 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Berat sampel} &= \text{berat beras} + 1 \text{ mL vitamin B}_3 \text{ 2,012 mg/mL} \\ &= (101,2945 + 0,002012) \text{ gram} \\ &= 101,296512 \text{ gram} = 101296,512 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Kadar vitamin B}_3 \text{ yang ditambahkan} = \frac{2,0128}{101296,512} \times 100\% = 1,99 \times 10^{-3} \% \text{b/b}$$

Data area dimasukkan ke dalam persamaan garis regresi:

$$y = 996,21692x + 1,03194$$

$$78,43435 = 996,21692x + 1,03194$$

$$x = 0,07765$$

0,07765 adalah kadar vitamin B₃ yang diinjeksikan yang berasal dari 5 mL volume sampel. Volume 5 mL tersebut berasal dari pemekatan 25 mL larutan sampel.

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi vitamin B}_3 \text{ dalam 25 mL larutan sampel} &= 0,07765 \times 5/25 \\ &= 0,01553 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Volume 25 mL berasal dari 10 mL destilat, yang berarti terjadi pengenceran sebanyak 2,5 kali, dan 10 mL destilat berasal dari 100 mL larutan awal. Sehingga, konsentrasi dalam 10 mL adalah $0,01553 \times 2,5 = 0,038825 \text{ mg/mL}$.

$$\begin{aligned} \text{Jumlah vitamin B}_3 \text{ dalam 100,0 mL larutan} &= 0,038825 \text{ mg/mL} \times 100 \text{ mL} \\ &= 3,8825 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Kadar vitamin B}_3 \text{ yang terdeteksi} = \frac{3,8825}{101296,512} \times 100 \% = 3,83 \times 10^{-3} \%$$

$$\text{Kadar rata-rata vitamin B}_3 \text{ blanko} = 2,13 \times 10^{-3} \%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_s - C_b}{W} \times 100\%$$

Dimana C_s = kadar vitamin B₃ yang terdeteksi pada sampel
 C_b = kadar vitamin B₃ pada blanko
 W = kadar vitamin B₃ yang ditambahkan

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(3,83 - 2,13) \times 10^{-3}}{1,99 \times 10^{-3}} \times 100\% = 85,43 \%$$

LAMPIRAN 5

PERHITUNGAN KADAR VITAMIN B₃ DI DALAM SAMPEL

Sampel	Berat Sampel (gram)	Area	Kadar vitamin B ₃ (mg/mL)	Kadar vitamin B ₃ (%b/b) x10 ⁻³	Kadar rata-rata vitamin B ₃ (%b/b) x10 ⁻³	
Beras putih	100,3471	35,05632	0,03419	1,70	1,85 ± 0,16	
	102,4516	42,22814	0,04135	2,02		
	101,1843	37,75259	0,03688	1,82		
Beras merah	102,4413	71,50435	0,07074	3,45	3,51 ± 0,20	
	100,4997	68,09442	0,06732	3,35		
	102,2729	77,12764	0,07638	3,73		
Air cucian beras putih	1	100,5169	20,41085	0,01945	0,97	1,09 ± 0,10
		102,4081	25,05329	0,02411	1,18	
		102,5259	23,72631	0,02276	1,11	
	2	100,5169	11,58845	0,01056	0,53	0,49 ± 0,04
		102,4081	11,19112	0,01016	0,50	
		102,5259	10,23116	0,09234	0,45	
	3	100,5169	Tidak terdeteksi			
		102,4081	Tidak terdeteksi			
		102,5259	Tidak terdeteksi			
Air cucian Beras merah	1	102,4877	43,76096	0,04289	2,09	1,96 ± 0,11
		100,2495	38,73328	0,03784	1,89	
		101,5964	39,55932	0,03867	1,90	
	2	102,4877	16,18616	0,01521	0,74	0,69 ± 0,04
		100,2495	14,31737	0,01334	0,67	
		101,5964	14,58069	0,01368	0,67	
	3	102,4877	9,20764	0,00821	0,40	0,36 ± 0,06
		100,2495	6,74521	0,00573	0,29	
		101,5964	8,75755	0,00755	0,38	

Contoh perhitungan kadar vitamin B₃ di dalam sampel beras putih replikasi pertama:

Diketahui data sebagai berikut:

Penimbangan sampel = 100,3471 gram

Area vitamin B₃ = 35,05632, dimasukkan ke persamaan regresi:

$$y = 996,21692x + 1,03194$$

$$x = 0,03419$$

Kadar vitamin B₃ sampel:

Dalam 1 µL = 0,03419 mg/mL

$$\text{Dalam 25 mL} = 0,03419 \times 5/25 = 0,006838 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \text{Dalam 100 mL} &= 0,006838 \times 25/10 = 0,017095 \text{ mg/mL} \times 100 \text{ mL} \\ &= 1,7095 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Kadar dalam sampel} = \frac{1,7095 \times 10^{-3} \text{ gram}}{100,3471 \text{ gram sampel}} \times 100\% = 1,70 \times 10^{-3} \% \text{ b/b}$$