

Validasi Metode Analisis β -Karoten Dengan Spektrofotometri UV-Vis Dan Aplikasinya Pada Penetapan Kadar β -Karoten Dalam Buah Labu Kuning

Abdon Saiya^{a*}, Joice D.S Caroles^a

^a Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Manado

INFO ARTIKEL

Diterima 12 Desember 2021

Disetujui 31 Maret 2023

*validasi metode analisis,
 β -karoten,
spektrofotometri UV-Vis*

*Analisis validation method
 β -karoten
UV-Vis spectrophotometri*

ABSTRACT

One of the appropriate, sensitive and selective instrumentation methods to determine β -carotene levels is UV-Vis spectrophotometry. In order for the measurement results to be valid and reliable, the measurement method must be validated. This study aims to validate the determination of β -carotene levels by UV-Vis spectrophotometry and apply it to pumpkin samples. The validation parameters include precision, linearity, limit of detection and limit of quantification. Based on the results obtained in this study, it can be concluded that the analysis performance of determining β -carotene by UV-Vis spectrophotometry is very good, as evidenced by measurement parameters such as accuracy as indicated by the coefficient of variation (KV) = 1.079%, linearity as expressed by the correlation coefficient (r) = 0.9996, limit of detection (LOD) = 0.0011 ppm and limit of quantification (LOQ) = 0.0036 ppm, all of which met the requirements. The levels of β -carotene in the pumpkin seeds analyzed varied from 9.52 to 13.76 $\mu\text{g}/\text{gram}$ sample.

ABSTRAK

Salah satu metode instrumentasi yang tepat, sensitif dan selektif untuk menentukan kadar β -karoten adalah spektrofotometri UV-Vis. Agar hasil pengukuran menjadi valid dan reliabel, metode pengukuran harus divalidasi. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi penentuan kadar β -karoten secara spektrofotometri UV-Vis dan menerapkannya pada sampel labu kuning. Parameter validasi meliputi presisi, linieritas, batas deteksi dan batas kuantifikasi. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa kinerja analisis penentuan β -karoten dengan spektrofotometri UV-Vis tergolong sangat baik, dibuktikan dengan parameter pengukuran seperti akurasi yang ditunjukkan oleh koefisien variasi (KV) = 1,079%, linearitas yang dinyatakan dengan koefisien korelasi (r) = 0,9996, batas deteksi (LOD) = 0,0011 ppm dan batas kuantifikasi (LOQ) = 0,0036 ppm, semuanya memenuhi persyaratan. Kadar β -karoten dalam biji labu yang dianalisis bervariasi dari 9,52 hingga 13,76 $\mu\text{g}/\text{gram}$ sampel.

abdonsaiya@unima.ac.id

Pendahuluan

Betakaroten merupakan salah satu produk karotenoid dengan aktivitas vitamin A tertinggi. [1]. Pigmen organik berwarna kuning, oranye atau merah-oranye dan dapat terjadi secara alami pada tanaman fotosintesis, ganggang, beberapa jamur dan bakteri [2] β -Karoten larut dalam lemak dan berperan sebagai pemulung oksigen dan radikal bebas. Beta-karoten dapat mengurangi risiko penyakit jantung, kanker, reproduksi dan penglihatan. β -Karoten melimpah pada tumbuhan[3]

Pada penelitian sebelumnya, validasi metode konsentrasi betakaroten dilakukan dengan menggunakan parameter pengukuran metode HPLC tervalidasi, meliputi akurasi, presisi, linieritas, batas deteksi dan batas kuantifikasi [4]. Hasil penelitian menunjukkan kinerja analisis determinasi betakaroten dengan metode HPLC sangat baik, yang menunjukkan parameter pengukuran seperti linearitas sebagai koefisien korelasi (r) = 0,9975, batas deteksi (LOD) = 1,57 ppm dan batas kuantifikasi. (LOQ) = 5,22 ppm, semuanya memenuhi persyaratan. Selain itu, diketahui bahwa penentuan kadar betakaroten juga dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis, karena rumus struktur β -karoten mengandung gugus kromoforik yang merupakan prasyarat untuk senyawa yang dianalisis. metode spektrofotometri UV-Vis [5] Hal inilah yang menyebabkan peneliti tertarik untuk menganalisis betakaroten menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Metode analisis baru dapat digunakan jika telah dilakukan validasi, dengan kondisi yang disesuaikan dengan laboratorium dan peralatan yang ada, meskipun metode yang digunakan telah dipublikasikan dalam jurnal, buku teks atau buku resmi seperti farmakope [6] Hal ini disebabkan oleh perbedaan dan keterbatasan alat, bahan kimia atau kondisi lain yang menghalangi penerapan metode tersebut secara penuh. [7]

Perubahan, penyederhanaan dan penambahan sering dilakukan pada metode, oleh karena itu metode harus divalidasi dengan cara yang benar. Jika metode tersebut dapat dianggap secara umum (linearitas, akurasi, presisi, limit deteksi dan limit kuantifikasi) tidak berbeda dan diakui oleh pihak yang berkompeten, maka metode yang dikembangkan dianggap valid dan dapat digunakan untuk analisis rutin. Beberapa parameter atau langkah yang dapat

dijadikan pedoman validasi metode antara lain linearitas, limit deteksi, limit kuantifikasi, akurasi, presisi, robustness, homogenitas, dan lain-lain. Pada penelitian ini dilakukan validasi penentuan kadar betakaroten secara spektrofotometri UV-Vis dengan parameter kunci yang diuji meliputi spesifisitas, linearitas, akurasi, presisi, limit deteksi dan limit kuantifikasi.

Bahan dan Metode

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Spektrofotometer PerkinElmer Lambda 25 UV-Vis, rotary evaporator, sonikator, neraca analitik, penyaring vakum dengan pori 0,4 – 0,45 μ m, pengaduk, corong pisah dengan penutup, penangas air, penyedot debu dengan pompa dan alat-alat gelas standar.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah: betakaroten, etanol, aseton, petroleum eter, sampel labu dan air suling.

1) Pembuatan Larutan Baku

Ditimbang teliti 10 mg β -karoten, kemudian dilarutkan dengan petroleum eter dalam labu takar 100 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya pipet masing-masing: 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL; dan 5,0 mL larutan 100 ppm tersebut ke dalam labu takar 10 mL dan diencerkan dengan petroleum eter hingga tanda tera, maka diperoleh larutan standar betakaroten dengan konsentrasi masing-masing 1,0 ppm; 2,0 ppm; 3,0 ppm; 4,0 ppm; dan 5,0 ppm.

2) Penentuan panjang gelombang serapan maksimum beta karoten

Larutan baku betakaroten diambil salah satu konsentrasinya kemudian diukur absorbansi larutannya dengan spektrometer UV-Vis Lambda 25 pada panjang gelombang 350 sampai 550 nm. Panjang gelombang serapan maksimum dipilih berdasarkan nilai serapan optimal [8]

3) Validasi Metode Analisis

Setelah menentukan panjang gelombang UV-Vis yang optimal, dilakukan validasi metode analisis dengan parameter yang akan dikonfirmasi, antara lain:

a. Presisi

Akurasi ditentukan oleh reproduktifitas, yang

ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan standar beta-karoten 5 ppm di bawah kondisi UV-Vis yang optimal. Pengukuran diulang 7 kali dan kemudian standar deviasi relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV) ditentukan.

b. Linearitas dan Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat dengan mengukur absorbansi larutan standar betakaroten: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ppm pada kondisi optimum UV-Vis yang diberikan. Kurva kalibrasi kemudian dibuat dengan memplot absorbansi (sebagai sumbu-y) terhadap konsentrasi larutan standar β -karoten (sebagai sumbu x), kemudian menghitung persamaan garis regresi dan koefisien korelasinya.

c. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Pada penelitian ini *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantification* (LOQ) dihitung secara statistik melalui garis regresi kurva kalibrasi. Nilai LOD dihitung menggunakan rumus berikut:

$$LOD = \frac{3 S_{(y/x)}}{b} \quad (1)$$

Sedangkan nilai LOQ dihitung dengan menggunakan persamaan:

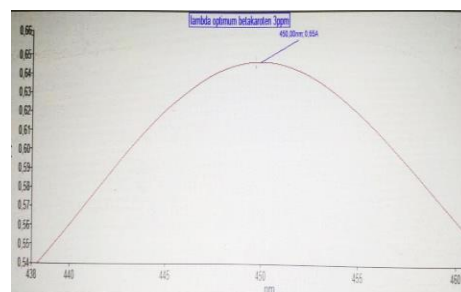
$$LOQ = \frac{10 S_{(y/x)}}{b} \quad (2)$$

Dimana $S_{(y/x)}$ adalah standar deviasi residual dan b adalah kemiringan persamaan garis regresi linier

Hasil dan Pembahasan

Panjang Gelombang Serapan Maksimum Betakaroten

Panjang gelombang penyerapan maksimum beta-karoten ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan standar 5 mg/L beta-karoten menggunakan spektrofotometer Lambda 25 UV-Vis pada rentang panjang gelombang 190-700 nm. Berdasarkan hasil pengukuran, panjang gelombang serapan larutan standar β -karoten adalah 50 nm (Gambar 1). Panjang gelombang maksimum ini konsisten dengan penelitian oleh Hiyama, yang melaporkan panjang gelombang 5 nm untuk β -karoten dalam aseton.



Gambar 1. Hasil pembacaan penentuan λ optimum β -karoten

Validasi Metode Analisis

Hasil validasi metode analisis penetapan kadar beta karoten dalam sampel labu kuning dijelaskan sebagai berikut.

a. Presisi

Presisi adalah ukuran tingkat kesesuaian antara hasil tes individu, diukur sebagai penyimpangan hasil individu dari rata-rata, ketika prosedur diterapkan berulang kali pada sampel yang diambil dari campuran homogen. Pada penelitian ini presisi ditentukan berdasarkan keterulangan absorbansi hasil pengujian dalam 6 ulangan larutan standar. Kriteria akurasi adalah ketika metode memberikan standar deviasi relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV) sebesar 2% atau kurang. Hasil pengukuran disajikan pada Tabel 1.

Table 1. Penentuan Repeatibility	
Pengukuran ke-	Absorbans
1	0,612
2	0,612
3	0,605
4	0,617
5	0,620
6	0,603
Rata-rata	0,612
Standar Deviasi (SD)	
Koefisien Variasi (KV)	1,079%

Berdasarkan hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 1 dapat diketahui bahwa nilai koefisien variasi (KV) untuk penentuan betakaroten 5 ppm sebesar 1,079%. Karena nilai KV kurang dari 2% maka metode analisis memiliki akurasi yang baik. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa sistem pengoperasian alat

dan analisis memiliki nilai *repeatability* yang baik untuk metode dengan respon yang relatif konstan, sehingga hasil pengukuran memiliki nilai presisi yang memenuhi persyaratan.

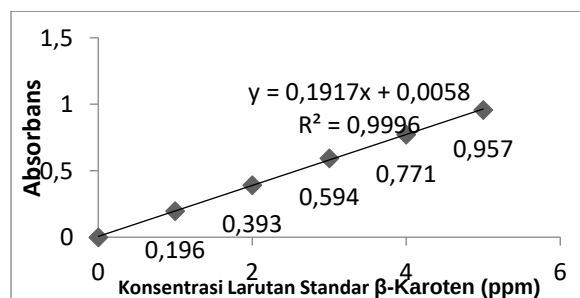
b. Linearitas dan Kurva Kalibrasi

Linearitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk memberikan respon yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linearitas biasanya dinyatakan sebagai varian dari garis regresi yang dihitung dari persamaan matematis data yang diperoleh dari percobaan analit dengan sampel konsentrasi analit yang berbeda. Parameternya adalah hubungan linier, koefisien korelasi r $y = a + bx$ digunakan dalam analisis regresi linier. Hubungan linier yang ideal tercapai bila nilai $a = 0$ dan $r = 1$ atau -1 tergantung arah garisnya [5]

Tabel 2. Data Hasil Pengukuran Absorbans Larutan Standar Betakaroten

Konsentrasi Standar β -karoten (ppm)	Absorbans
0,0	0
1,0	0,196
2,0	0,393
3,0	0,594
4,0	0,771
5,0	0,957

Berdasarkan hasil pengukuran larutan standar betakaroten 5 seri pada rentang konsentrasi 1,0 - 5,0 ppm, diperoleh hasil pengukuran absorbansi sesuai Tabel 2 dan garis regresi kurva kalibrasi dengan persamaan $y = 0,1917x + 0,0058$ dan nilai koefisien korelasi $R^2 = 0,9996$ sesuai Gambar 2.



Gambar 2. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Betakaroten

Nilai regresi yang baik adalah jika $R^2 > 0,99$. Data hasil

pengukuran menunjukkan bahwa nilai koefisien korelasi yang diperoleh telah memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam pengukuran analisis rutin.

c. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Limit deteksi (LOD) adalah jumlah analit terkecil yang dapat dideteksi dalam sampel yang terus memberikan respons yang signifikan dibandingkan dengan blanko, sedangkan limit kuantitasi (LOQ) adalah parameter analitik mikroskopis dan didefinisikan sebagai jumlah terkecil dari analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria ketelitian dan ketelitian. Nilai LOD dan LOQ dihitung secara statistik dengan garis regresi kurva kalibrasi.

Berdasarkan hasil penelitian spektrofotometri UV-Vis untuk kadar betakaroten didapatkan nilai LOD sebesar 0,0011 ppm dan nilai LOQ sebesar 0,0036 ppm. Limit deteksi berguna dalam menentukan respon yang ditimbulkan oleh suatu analisis

Penetapan Kadar Betakaroten dalam Sampel Labu Kuning

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memvalidasi metode analisis betakaroten dan menerapkannya pada penentuan konsentrasi betakaroten dalam sampel buah labu kuning.[9] Hasil pengukuran dan perhitungan kadar betakaroten sampel labu kuning disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Kadar Betakaroten dalam Jonjot Buah Labu Kuning

Sampel	Kadar Betakaroten (ppm)
A1	13,23
A2	11,91
A3	9,52
B1	13,52
B2	13,34
B3	10,81
C1	13,70
C2	13,66
C3	12,76

Daftar Pustaka

1. Van Arnum, S.D. Vitamin A. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*; John Wiley &

- Sons, Inc., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2000; p. 2209200101181421.a01 ISBN 978-0-471-23896-6.
2. Mangunsong, S.; Assiddiqy, R.; Sari, E.P.; Marpaung, P.N.; Sari, R.A. Penentuan β -Karoten Dalam Buah Wortel (*Daucus Carota*) Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (U-HPLC). *Aceh. Nutri. J.* **2019**, *4*, 36, doi:10.30867/action.v4i1.151.
3. Styawan, A.A.; Hidayati, N.; Susanti, P. Penetapan Kadar β -Karoten Pada Wortel (*Daucus Carota*, L) Mentah Dan Wortel Rebus Dengan Spektrofotometri Visibel. *JFSP* **2019**, *5*, 6–10, doi:10.31603/pharmacy.v5i1.2293.
4. Saiya, A.; Gumolung, D.; Howan, D.H.O. Optimasi Dan Validasi Metode Analisis Residu Klorpirifos Menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *fullerene journ of chem* **2017**, *2*, 103, doi:10.37033/fjc.v2i2.20.
5. Harmita, H. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya. *Mik* **2004**, *1*, 117–135, doi:10.7454/psr.v1i3.3375.
6. Ortega-Barrales, P.; Padilla-Weigand, R.; Molina-Díaz, A. Simultaneous Determination of Paracetamol and Caffeine by Flow Injection–Solid Phase Spectrometry Using C18 Silica Gel as a Sensing Support. *ANAL. SCI.* **2002**, *18*, 1241–1246, doi:10.2116/analsci.18.1241.
7. Ahmad, W.; Hassan, Y.A.; Ahmad, A.; Suroor, M.; Sarafroz, M.; Alam, P.; Wahab, S.; Salam, S. A Simple Stability-Indicating UPLC Method for the Concurrent Assessment of Paracetamol and Caffeine in Pharmaceutical Formulations. *Separations* **2023**, *10*, 50, doi:10.3390/separations10010050.
8. ALTUN, M. HPLC Method for the Analysis of Paracetamol, Caeine and Dipyrone. *Turkish Journal of Chemistry* **2002**, *26*, 521–528.
9. Hayun, H.; Harahap, Y.; Azizah, C.N. Penetapan Kadar Sakarin, Asam Benzoat, Asam SORBAT, Kofeina, Dan Aspartam Di Dalam Beberapa Minuman Ringan Bersoda Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *MIK* **2004**, *1*, 148–159, doi:10.7454/psr.v1i3.3377.
10. Panggabean, A.S., Pasaribu, S.P., Vinanda, N., dan Hairani, R. 2011. Optimasi Kinerja Analitik pada Penentuan Beta karoten dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Kimia Mulawarman*. 8 (2) : 70-73
11. Kogan, L. dan Frederick, J.D. 1953. Determination of Caffeine and Trigonelline in Coffe by Paper Chromatography. *New York: Journal the Fleischmann Laboratories of Standard Brands, Inc.* Vol. 25, No.7
12. Kriswanto., Permanasari, A., dan Fatimah, S.S. 2014. Pengembangan dan Uji Validasi Metode Analisis Kadar Parasetamol dan Beta karoten dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Sains dan Teknologi Kimia*. 5(1): 51-5

