

PENETAPAN KADAR RIBOFLAVIN, PIRIDOKSIN HCl, DAN ASAM FOLAT DALAM SUSU FORMULA BAYI DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

Nurmahida Pagama, Yusnita Rifai dan Muhammad Aswad

Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar

ABSTRAK

Susu formula bayi merupakan pengganti air susu ibu yang diproduksi untuk memenuhi kebutuhan gizi bayi selama bulan-bulan pertama kehidupannya hingga pengenalan makanan pelengkap yang sesuai. Riboflavin, piridoksin HCl dan asam folat diekstraksi dari susu formula bayi dengan dapar fosfat pH 4,5 dan asetonitril yang telah diasamkan dengan asam fosfat. Kondisi kromatografi yang digunakan: kolom Atlantis C18 4.6 x 150 mm 5 µm, fase gerak terdiri dari dapar fosfat pH 4,5 dan campuran asetonitril dengan dapar fosfat pH 4,5 (7:3), menggunakan sistem kromatografi gradien dengan laju alir 0,5 mL/menit. Riboflavin diukur pada panjang gelombang 270 nm, piridoksin HCl 290 nm dan asam folat 280 nm. Dari hasil uji linieritas diperoleh nilai $r > 0.999$ dan nilai VX_0 kurang dari 5% yaitu berkisar antara 2.28-2.79%, dengan rentang konsentrasi larutan standar yaitu 0,05-10,00 µg/mL untuk riboflavin, piridoksin HCl 0,03-2,00 µg/mL dan asam folat 0,01-2,00 µg/mL. Presisi yang disajikan dalam bentuk relative standard deviation (%RSD) untuk analisa riboflavin, piridoksin HCl dan asam folat berturut-turut adalah: 0,75; 3,60 dan 1,21%. Hasil evaluasi menunjukkan kadar masing-masing 10,95 µg/g untuk riboflavin, 3,97 µg/g untuk piridoksin dan 0,96 µg/g untuk asam folat. Riboflavin, piridoksin HCl dan asam folat dapat ditetapkan kadarnya secara simultan dengan KCKT detektor UV pada kondisi analisis yang disebutkan.

Kata Kunci :

KCKT, susu formula, riboflavin, piridoksin HCl, asam folat

PENDAHULUAN

Vitamin dibedakan menjadi senyawa larut air dan larut lemak. Riboflavin, piridoksin HCl dan asam folat termasuk vitamin larut air. Vitamin dibutuhkan oleh manusia dalam jumlah relatif kecil untuk membantu berbagai proses kehidupan dan kesehatan manusia. Tubuh manusia tidak dapat memproduksi vitamin oleh karena itu harus diperoleh dari luar baik bersumber dari makanan maupun minuman. Kebutuhan vitamin meningkat selama masa kehamilan, menyusui, dan masa pertumbuhan. Terkadang, kebiasaan makan bisa membuat kekurangan vitamin dan memicu beberapa penyakit kronis (1).

Piridoksin HCl diperlukan untuk sintesis neurotransmitter pada sistem saraf (2). Folat berperan penting dalam sintesa beberapa jenis asam amino dan berbagai reaksi biosintesis, katabolik dan reaksi interkonversi dan sintesis pirimidin. Defisiensi folat pada ibu hamil dapat menyebabkan cacat lahir pada bayi, *down syndrome*, *orofacial clefts* dan *congenital heart defects* (3). Riboflavin penting untuk aktifitas vitamin B6 dan konversi triptofan ke niasin (4). Selain itu riboflavin juga bertindak sebagai koenzim dehidrogenasene dan esensial bagi metabolisme glukosa serta asam lemak (5).

Meskipun air susu ibu (ASI) merupakan sumber nutrisi bayi yang paling optimal, banyak orang tua menggunakan susu formula sebagai pengganti ASI. Susu formula bayi memiliki kandungan nutrisi lebih sedikit dibandingkan ASI termasuk berbagai jenis sel hidup, kolesterol, poliamina, asam amino bebas, enzim dan berbagai macam zat bioaktif lainnya (6).

Susu yang layak dikonsumsi oleh manusia melewati berbagai proses guna mencegah adanya bahaya terhadap kesehatan yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen yang ada dalam susu mentah. Susu cair diproduksi melalui proses pemanasan seperti pasteurisasi ultra-heat treatment atau ultra-high temperature (UHT) dan sterilisasi. Sedangkan untuk membuat susu kering (serbuk), pertama susu dipanaskan kemudian dikeringkan melalui proses spray drying, roller-drying, atau drum drying. Proses-proses ini akan merusak beberapa nutrisi terutama vitamin yang secara alami terdapat dalam susu (7). Oleh karena itu diperlukan suatu metode untuk menentukan kadar vitamin dalam susu formula (riboflavin, piridoksin, asam folat) guna memastikan asupan vitamin yang diperoleh dari susu formula sesuai untuk kebutuhan bayi. Metode ini harus sederhana dengan akurasi tinggi, reproducible, dan hasil yang stabil.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan Penelitian

HPLC Shimadzu® LC 20 AD, kolom Atlantis® T3 C18 4.6 x 150 mm 5 µm, sistem pemurnian air ELGA PureLab Flex, Power Sonic 410, neraca mikro (Sartorius®), neraca analitik (Sartorius®), pH Meter (Mettler Toledo®), Multi-tube Carrier Refrigerated Centrifuge, vortex, pipet Eppendorf dan alat-alat gelas.

Standar vitamin riboflavin BPF1, piridoksin HCl BPF1 dan asam folat BPF1 (diperoleh dari laboratorium baku pembanding PPPOMN),

Masuk 01-06-2018

Revisi 06-08-2018

Diterima 30-08-2018

Korespondensi

Nurmahida Pagama

nurmahida.p78@gmail.com

Copyright

© 2018 Majalah Farmasi

Farmakologi Fakultas

Farmasi · Makassar

Diterbitkan tanggal

31-08-2018

Dapat Diakses Daring

Pada:

<http://journal.unhas.ac.id>

[/index.php/mff](http://index.php/mff)



asetonitril gradient grade for Liquid Chromatography (Merck), metanol gradient grade for Liquid Chromatography (Merck), kalium dihidrogen fosfat (Merck), natrium hidroksida (Merck), asam fosfat 85 % (Merck), asam asetat glasial (Merck), susu formula bayi dalam bentuk serbuk dengan kemasan dus, membrane filter 0,45 μm , syringe filter 0,45 μm , kertas saring Agilent PTFE 0,45 μm .

Prosedur Penelitian

Kondisi Analisis

Pada penelitian ini digunakan KCKT detektor UV dengan sistem elusi gradien di mana komposisi fase gerak berubah selama proses pengukuran berlangsung. Fase gerak yang digunakan adalah dapar fosfat 10 mM pH 4,5 (A) dan campuran dapar fosfat : asetonitril, 7:3 (B). Sebagai fase diam digunakan kolom Atlantis T3 C18 (4,6 mm x 150 mm), 5 μm . Suhu oven 35 $^{\circ}\text{C}$, dengan laju alir 0,5 mL/menit dan volume penyuntikan 20 μL . Detektor UV diset pada panjang gelombang 290 nm untuk pengukuran piridoksin HCl, 280 nm untuk asam folat dan 270 nm untuk riboflavin.

Uji Kesesuaian Sistem

Larutan baku riboflavin dengan konsentrasi 2 $\mu\text{g/mL}$, piridoksin HCl 0,4 $\mu\text{g/mL}$, dan asam folat 0,4 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan ke KCKT sebanyak 20 μL pada kondisi analisa yang sesuai. Penyuntikan diulang minimal 5 kali. Jumlah lempeng teoritis, faktor kapasitas, resolusi, faktor ikutan (tailing factor), dan standar deviasi relatif luas area puncak dan waktu retensi dihitung untuk mengetahui apakah uji kesesuaian sistem memenuhi syarat.

Linearitas

Larutan baku kerja riboflavin dibuat dengan konsentrasi 0,0504; 0,1259; 0,2518; 0,5036; 1,0071; 2,0142; 4,0284; 8,0569 dan 10,0711 $\mu\text{g/mL}$. Larutan baku kerja piridoksin HCl dibuat dengan konsentrasi 0,0126; 0,0315; 0,0629; 0,1259; 0,2518; 0,5035; 1,0070; 2,0141 dan 2,5176 $\mu\text{g/mL}$. Larutan baku kerja asam folat dibuat dengan konsentrasi 0,0108; 0,0269; 0,0538; 0,1075; 0,2151; 0,4302; 0,8603; 1,7207 dan 2,1508 $\mu\text{g/mL}$. Larutan baku kemudian disuntikkan sebanyak 20 μL ke KCKT. Dari hasil analisa yang diperoleh, kemudian dibuat perbandingan antara luas area (y) terhadap konsentrasi riboflavin, piridoksin HCl, dan asam folat (x). Koefisien korelasi (r) dihitung dari persamaan garis regresi linier tersebut dan juga nilai VX0.

Presisi

Sampel susu dihomogenkan dan ditimbang sebanyak 6 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu propilen 50 mL. Larutan dapar fosfat pH 4,5 ditambahkan sebanyak 20 mL, divorteks selama 15 menit. Asetonitril yang telah diasamkan dengan 20 μL asam fosfat 85% ditambahkan sebanyak 20 mL, dihomogenkan dengan vortex selama 3 menit. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 30 menit. Filtrat diambil sebanyak 10 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Dikeringkan hingga kurang lebih 1 mL dengan menggunakan nitrogen evaporator. Dipindahkan ke labu takar amber 10 mL, volumenya dicukupkan hingga tanda dengan dapar fosfat pH 4,5. Larutan dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit. Larutan disaring dengan membrane filter 0,45 μm ke dalam vial amber 2 mL dan diawadarkan selama 5 menit. Diinjeksikan ke KCKT sebanyak 20 μL . Dilakukan minimal enam (6) kali pengerjaan sampel yang sama untuk menentukan presisi.

Akurasi

Sampel susu yang telah dihomogenkan ditimbang sebanyak 6 g dan di masukkan ke dalam labu propilen 50 mL. Ditambahkan standar riboflavin piridoksin dan asam folat.

Larutan dapar fosfat pH 4,5 ditambahkan sebanyak 20 mL, divorteks selama 15 menit.

Asetonitril yang telah diasamkan dengan 20 μL asam fosfat 85% ditambahkan sebanyak 20 mL, dihomogenkan dengan vortex selama 3 menit. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 30 menit. Filtrat diambil sebanyak 10 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi amber. Dikeringkan hingga kurang lebih 1 mL dengan menggunakan nitrogen evaporator. Dipindahkan ke labu amber 10 mL, volumenya dicukupkan hingga tanda dengan dapar fosfat pH 4,5. Larutan dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit. Larutan disaring dengan membrane filter 0,45 μm ke dalam vial amber 2 mL dan diawadarkan selama 5 menit. Diinjeksikan ke KCKT sebanyak 20 μL . Dilakukan tiga (3) kali replikasi pengerjaan sampel yang sama untuk menentukan akurasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, optimasi penetapan kadar riboflavin, piridoksin HCl dan asam folat meliputi penentuan fase gerak dan laju alir serta metode ekstraksi analit dari susu formula. Sistem elusi yang digunakan adalah sistem gradien di mana komposisi fase gerak berubah selama proses pengukuran berlangsung. Kolom yang digunakan adalah kolom reversed-phase Atlantis T3 C18 dengan dimensi 4,6 mm x 150 mm, diameter partikel 0,5 μm . Kecepatan alir 0,5 mL/menit, suhu oven 35 $^{\circ}\text{C}$ dengan volume penyuntikan 20 μL . Sebagai fase gerak, digunakan dapar fosfat pH 4,5 dan campuran pelarut asetonitril : dapar fosfat pH 4,5 (7:3). Detektor diset pada panjang gelombang 270 nm untuk penukuran riboflavin, 280 nm untuk asam folat dan 290 nm untuk piridoksin HCl.

Fase gerak dibuat segar untuk menjamin pH larutan dapar tidak berubah juga tidak ada pertumbuhan mikroba. Pelarut dan pereaksi harus berkualitas tinggi untuk mencegah terjadinya puncak-puncak palsu pada baseline kromatogram sehingga menyulitkan pengukuran. Fase gerak harus disaring terlebih dahulu sebelum digunakan dengan penyaring membran 0,45 μm dan disonikasi untuk menghilangkan gas yang terdapat di dalamnya untuk menghindari berkumpulnya gas pada pompa dan detektor yang dapat mengacaukan analisis. UV cut off pelarut organik dan dapar harus diperhatikan khususnya saat melakukan analisis pada panjang gelombang di bawah 200 nm. Gangguan ultraviolet dari dapar dan pelarut organik akan mengurangi sensitifitas detektor yang akan menyebabkan gangguan pada baseline.

Sistem KCKT harus diuji terlebih dahulu sebelum digunakan melalui uji kesesuaian sistem untuk menjamin bahwa sistem operasional KCKT memberikan hasil yang sesuai untuk tujuan analisis. Hal ini dikarenakan banyak faktor yang dapat memberikan perbedaan hasil uji seperti jenis kolom, umur kolom, komposisi dan pH fase gerak. Uji kesesuaian sistem dilakukan minimal 5 kali penyuntikan.

Tabel 1. Hasil uji rata-rata kesesuaian sistem analisis

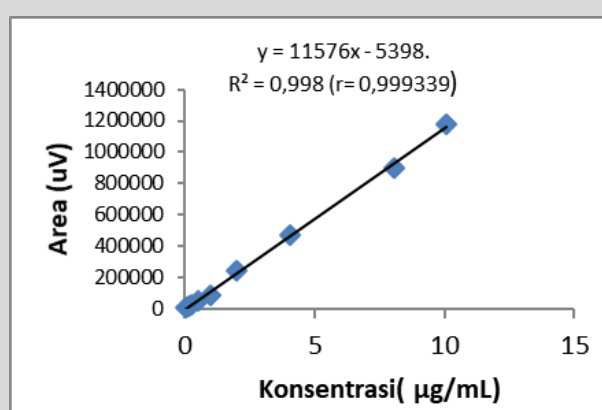
Analit	Rata-Rata Nilai				
	N	Rs	T	RSD Area (%)	k'
Riboflavin	141845,879	16,568	1,265	0,386	1,491
Piridoksin HCl	7922,316	0,000	1,293	0,164	0,000
Asam Folat	113707,526	30,762	1,344	0,854	1,069
Syarat	≥ 2000	$\geq 1,5$	$\leq 1,5$	$< 2,0$	1 - 10

Keterangan: N= Jumlah lempeng teoritis; T= Faktor ikutan; Rs= Resolusi; RSD= Relative percent difference; k'= faktor kapasitas

Tabel 2. Pengukuran linieritas riboflavin

No.	Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Area (μV)
1.	0,050355	6842
2.	0,125889	13192
3.	0,251777	26366
4.	0,503554	48147
5.	1,007109	87185
6.	2,014218	241834
7.	4,028436	473190
8.	8,056873	900540
9.	10,071091	1176723

$Y = 115767,4414X - 5398,7068$; r hitung = 0,999339, $V_{x0} = 2,79\%$

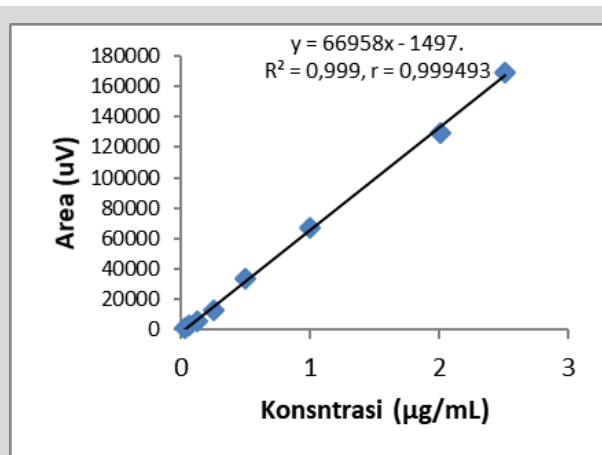


Gambar 1. Kurva linieritas standar riboflavin.

Tabel 3. Hasil uji linieritas piridoksin HCl

No.	Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Area (μV)
1.	0,031470	1615
2.	0,062941	3275
3.	0,125882	6138
4.	0,251764	13034
5.	0,503527	33902
6.	1,007055	67053
7.	2,014110	129818
8.	2,517637	169374

$Y = 66957,57311X - 1497,3111$; r hitung = 0,999493, $V_{x0} = 2,28\%$

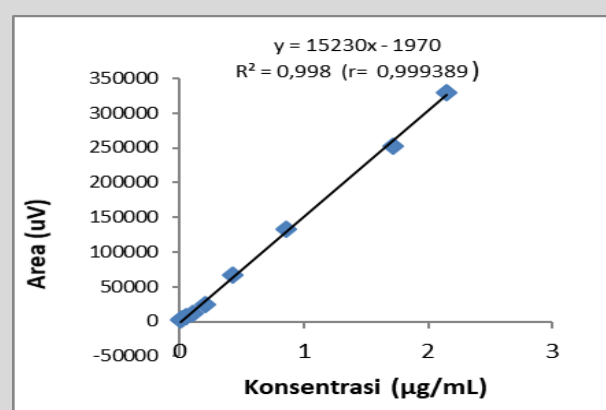


Gambar 2. Kurva linieritas standar Piridoksin HCl

Tabel 4. Hasil uji linieritas asam folat

No.	Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Area (μV)
1.	0,010754	1754
2.	0,026886	3379
3.	0,053771	7009
4.	0,107543	12321
5.	0,215086	24309
6.	0,430171	67528
7.	0,860343	132287
8.	1,720686	253130
9.	2,150857	329797

$Y = 152301,4683X - 1970,2974$; r hitung = 0,999389, $V_{x0} = 2,68\%$



Gambar 3. Kurva linieritas standar asam folat.

Penetapan linieritas dilakukan untuk melihat apakah metode analisa dapat memberikan respon yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Dilakukan penentuan linieritas dengan 9 konsentrasi berbeda, yaitu standar riboflavin dengan konsentrasi 0,05-10,00 $\mu\text{g/mL}$, piridoksin HCl 0,03-2,00 $\mu\text{g/mL}$ dan asam folat konsentrasi 0,01-2,00 $\mu\text{g/mL}$. Linieritas dikatakan baik jika koefisien determinasi (R^2) $>0,997$ atau $r >0,999$ dengan nilai V_{x0} sebagai parameter lain dari linieritas harus kurang dari 5% (8).

Tabel 5. Hasil uji presisi riboflavin

No.	Area (μV)	Kadar ($\mu\text{g/g}$)
1	186026	10,9948
2	184917	10,9582
3	184617	10,9418
4	186649	11,0482
5	185574	10,9818
6	182497	10,8034
Rata-rata		10,9547
Standar deviasi		0,0826
RSD (%)		0,75
Syarat (RSD Horwitz)		7,44

Kemudian dilakukan uji presisi dengan 6 replikasi di mana kriteria penerimaan RSD lebih kecil dari $2/3 \times CV$ Horwitz. CV Horwitz = $2 \cdot 1 - 0,5 \log C$, di mana c adalah fraksi konsentrasi. Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif (RSD) (Gandjar dan Rohman, 2014). Dari hasil perhitungan diperoleh kadar riboflavin 10,96 $\mu\text{g/g}$, piridoksin HCl 3,97 $\mu\text{g/g}$ dan asam folat 0,96 $\mu\text{g/g}$ dengan nilai RSD masing

masing 0,75% untuk riboflavin, 3,60 % untuk piridoksin HCl dan 1,21% untuk asam folat.

Tabel 6. Hasil uji presisi piridoksin HCl

No.	Area (uV)	Kadar (µg/g)
1	39220	4,0435
2	39450	4,0764
3	37626	3,8951
4	37453	3,8742
5	36419	3,7698
6	40192	4,1443
Rata-rata		3,9672
Standar deviasi		0,1428
RSD (%)		3,60
Syarat (RSD Horwitz)		8,67

Tabel 7. Hasil uji presisi asam folat

No.	Area (uV)	Kadar (µg/g)
1	19737	0,9477
2	19897	0,9571
3	20030	0,9630
4	20234	0,9710
5	20081	0,9639
6	20494	0,9818
Rata-rata		0,9641
Standar deviasi		0,0117
RSD (%)		1,21
Syarat (RSD Horwitz)		10,72

Selanjutnya dilakukan penentuan akurasi untuk mengetahui kedekatan antara nilai terukur dengan nilai sebenarnya yang ditunjukkan dengan persen perolehan kembali (%recovery). Akurasi diukur dengan menambahkan analit pada tiga (3) konsentrasi yang berbeda, masing-masing tiga replikasi. Berdasarkan hasil perhitungan yang diperoleh, akurasi piridoksin dan asam folat memenuhi syarat yang ditetapkan yaitu 80-110%. Akurasi riboflavin pada penambahan standar riboflavin 3,8955 µg tidak memenuhi syarat. Hal ini kemungkinan disebabkan karena kadar riboflavin pada penambahan standar riboflavin 3,8955 µg telah melewati limit pembacaan detektor. Kemungkinan yang lain adalah

Tabel 8. Hasil uji akurasi riboflavin

Σ Riboflavin yang ditambahkan (µg)	Replikasi ke-	Perolehan kembali (%)	Syarat perolehan kembali (%)
2,6969	1	95,39	80 - 110
	2	108,46	
	3	94,40	
3,2588	1	90,82	80 - 110
	2	100,40	
	3	90,74	
3,8955	1	-	80 - 110
	2	-	
	3	-	

adanya analit riboflavin yang hilang selama proses preparasi dan proses pemisahan riboflavin dari komponen-komponen lain yang ada dalam susu yang tidak sempurna.

Tabel 9. Hasil uji akurasi piridoksin HCl

Σ Piridoksin HCl yang ditambahkan (µg)	Replikasi ke-	Perolehan kembali (%)	Syarat perolehan kembali (%)
0,9526	1	89,61	80 - 110
	2	87,68	
	3	108,67	
1,0825	1	85,80	80 - 110
	2	83,22	
	3	89,78	
1,4290	1	95,03	80 - 110
	2	98,73	
	3	101,45	

Tabel 10. Hasil uji akurasi asam folat

Σ Asam Folat yang ditambahkan (µg)	Replikasi ke-	Perolehan kembali (%)	Syarat perolehan kembali (%)
0,9526	1	89,61	80 - 110
	2	87,68	
	3	108,67	
1,0825	1	85,80	80 - 110
	2	83,22	
	3	89,78	
1,4290	1	95,03	80 - 110
	2	98,73	
	3	101,45	

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kadar riboflavin, piridoksin dan asam folat dalam susu formula bayi dapat ditentukan secara simultan dengan KCKT detektor UV sedangkan riboflavin tidak

DAFTAR PUSTAKA

1. Maria Katsa; Charalampos Proestos; Efstratios Komaitis. 2016. Determinations of fat soluble vitamins. 92-96.
2. Dakshinamurti, S.; Dakshinamurti, K. 2007. Vitamin B6, In Handbook of vitamins, Fourth ed.; Zempleni, J., Rucker, R. B. and McCormick D. B., S.J.W., Eds.; CRC Press: Boca Raton. p. 315.
3. Hobbs, C. A.; Shaw, G. M.; Werler, M. M.; Mosley, B. 2010. Folate status and birth defect risk. Epidemiological perspective. In L. B. Bailey (Ed.), Folate in Health and Disease, (2nd edition). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press (Taylor & Francis Group, LLC). pp. 133-153.
4. Navarra, T. 2004. The encyclopedia of vitamins, minerals and supplements. Facts On File, Inc: New York, NY.
5. György, P. 2008. Riboflavin, In The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. Third ed.; Combs, G.F., Ed.; Elsevier Academic Press. Boston. p. 281.
6. O'Connor, MD. 2009. Infant Formula. American Family Physician. Volume 79, Number 7, p. 565.
7. USAID. Fortification Basic.
8. Yuwono, M., Indrayanto, G., 2005. Validation of chromatographic method of analysis. Profiles of drug substances, excipients, and related Methodology, Vol. 32, p. 243-259.

Sitasi artikel ini: Pagama N, Rifai Y, Aswad M. Penetapan Kadar Riboflavin, Piridoksin HCl, dan Asam Folat dalam Susu Formula Bayi Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). MFF 2018;22(2):40-43