

PENGUNAAN METODE KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS KINERJA TINGGI (KLTKT)-DENSITOMETRI DALAM PENETAPAN KADAR VITAMIN B₁ PADA KACANG KEDELAI (*Glycine max*)

Sestry Misfadhila*, Ijazati Alfitroh, Sanezea Effendy, Endang Agustina

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang.

Email: sestrymisfadhila@stifarm-padang.ac.id

ABSTRAK

Kedelai (*Glycine max*) diketahui mengandung berbagai nutrisi salah satunya vitamin B₁ atau tiamin. Tiamin merupakan vitamin yang dibutuhkan untuk menimbulkan nafsu makan, membantu penggunaan karbohidrat dalam tubuh dan sangat berperan dalam sistem saraf. Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar vitamin B₁ pada kacang kedelai dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (KLTKT)-Densitometri. Sampel diekstraksi dengan menggunakan air suling 20 mL dan metanol 30 mL. Analisis dengan KLT menggunakan metanol: air: asam asetat: amoniak (5: 4,5: 0,5: 0,75) sebagai fase gerak dan silika gel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam. Hasil KLTKT menunjukkan bahwa sampel memiliki nilai R_f yang sama dengan pembanding (R_f = 0,5). Linearitas vitamin B₁ diperoleh pada rentang konsentrasi 100-500 µg/mL dengan nilai koefisien korelasi 0,998 dan persamaan regresi $y = 238,4 + 5,575x$. Nilai simpangan baku 37,1724 µg/mL, batas deteksi 20,0031 µg/mL dan batas kuantitasi 66,677 µg/mL. Analisis kuantitatif menggunakan densitometri diperoleh kadar vitamin B₁ sebesar $0,0599 \pm 0,002363$ %.

Kata Kunci: Kacang Kedelai, Vitamin B₁, Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max*) contains various nutrients, one of which is vitamin B₁ or thiamine. Thiamine is a vitamin needed to stimulate appetite, helps use carbohydrates in the body, and plays an essential role in the nervous system. In this study, the determination of vitamin B₁ levels in soybeans was carried out using high-performance thin layer chromatography (TLC)-densitometry. Samples were extracted using 20 mL distilled water and 30 mL methanol. Analysis by TLC used methanol: water: acetic acid: ammonia (5: 4.5: 0.5: 0.75) as the mobile phase and silica gel 60 F₂₅₄ as the stationary phase. The TLC results showed that the sample had the same R_f value as the control (R_f = 0.5). Linearity of vitamin B₁ was obtained in the concentration range of 100-500 µg/mL with a correlation coefficient of 0.998 and a regression equation $y = 238.4 + 5.575x$. The standard deviation value was 37.1724 µg/mL, the limit of detection was 20.0031 µg/mL, and the limit of quantitation was 66.677 µg/mL. Quantitative analysis using densitometry obtained vitamin B₁ levels of 0.0599 ± 0.002363 %.

Keywords: Soy bean, Vitamin B₁, High Performance Thin Layer Chromatography

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max*) merupakan bahan makanan yang sudah cukup lama dikenal oleh masyarakat Indonesia. Pada umumnya, kedelai tidak dimasak secara langsung, melainkan melalui proses pengolahan terlebih dahulu misalnya menjadi tempe, tahu, kecap, touco, susu, dan minuman sari

kedelai. Kedelai memiliki kandungan gizi yang tinggi yang berperan untuk membentuk sel-sel tubuh dan menjaga kondisi sel-sel tersebut (Suhardi, *et al.*, 2002).

Kedelai (*Glycine max*) merupakan sumber utama protein, energi, lemak, serat, vitamin (vitamin A, vitamin B₁, dan vitamin C), mineral dan nutrisi lainnya bagi manusia dan ternak

(Brumm, *et al.*, 2002). Selain itu, kacang kedelai juga mengandung senyawa isoflavon (genistin, daidzin, dan glisitin) (Wang & Murphy, 1994; Carrao-Panizzi, *et al.*, 2002), dan asam amino (isoleusin, leusin, lisin, fenilalanin, tirosin, methionin, sistein, treonin, triptofan dan valin) (Pitojo, 2003).

Vitamin B₁ atau tiamin merupakan gabungan dari senyawa dengan cincin utama pirimidin dan senyawa dengan cincin utama tiazol (Andrawulan & Koswara, 1992). Kekurangan tiamin akan menyebabkan suatu bentuk polineuritis yang dikenal sebagai beri-beri (Hardman & Limbird, 2007).

Kromatografi lapis tipis mempunyai kelebihan diantaranya adalah deteksi melalui reaksi kimia dengan menggunakan reagen penampak. Setiap jenis senyawa dapat dideteksi dengan menggunakan reagen deteksi yang sesuai, serta dikombinasikan dengan densitometer. Metode ini dapat digunakan sebagai teknik kuantitatif untuk senyawa-senyawa yang sulit dianalisis dengan metode-metode lain karena tidak adanya gugus kromofor (Watson, 1999).

Pada penelitian ini kadar vitamin B₁ yang terdapat pada kacang kedelai (*Glycine max*) ditentukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (KLTKT)-Densitometri.

METODE

Alat

TLC Scanner 4 (Camag), UV Lamp 254 nm (Camag), bejana pengembangan (Camag), timbangan analitik (Precisa), pipet mikro, dan peralatan gelas.

Bahan

Baku pembanding vitamin B₁ (PT Indo Pharma), metanol (Merck), amoniak (NH₃) (Merck), kalium heksasianoferat (K₃[Fe(CN)₆]) (Merck), timbal asetat

(Pb(C₂H₃O₂)₃) (Merck), asam klorida (HCl) (Merck), air suling (PT Brataco), natrium hidroksida (NaOH) (PT Brataco), n-butanol (Merck), natrium nitrit (NaNO₂) (PT Brataco), 2- naftol, dan silika Gel 60 F₂₅₄ (Merck).

Cara Kerja

A. Pembuatan Reagen dan Larutan Uji

1. Pereaksi Diazo

- a. Diazo I : 10 g natrium nitrit yang ditimbang seksama, dimasukan ke dalam labu 100 mL dan di cukupkan dengan air suling sampai tanda batas
- b. Diazo II : 0,25 g 2- naftol yang ditimbang seksama dilarutkan ke dalam 100 mL NaOH 3 N.

2. Pembuatan larutan induk vitamin B₁ Pembanding

Ditimbang seksama 50 mg larutan baku pembanding vitamin B₁ lalu dimasukan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambah dengan air suling sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan baku pembanding vitamin B₁ dengan konsentrasi 500 µg/mL (Liu, *et al.*, 2002).

3. Pembuatan larutan uji untuk analisis kuantitatif.

Sampel kacang kedelai ditimbang sebanyak 5 gram, diblender, kemudian ditambahkan dengan 20 mL air suling pada gelas piala. Campuran diaduk dengan *vortex mixer*, tambahkan 30 mL metanol, saring dan kemudian masukkan ke dalam labu ukur 25 mL.

B. Identifikasi Vitamin B₁ dengan Reaksi Warna

1. Reaksi Tiokrom

Sejumlah 10 mg zat ditambahkan dengan 3 mL NaOH 1 N, 2 tetes kalium heksasianoferat (III) 5 % yang dibuat segar dengan 5 mL *n*-butanol, kemudian dikocok kuat selama beberapa menit. setelah terpisah larutan uji dan larutan baku

- pembanding akan berfluoresensi biru ungu.
2. Reaksi Timbal Asetat
Sejumlah 10 mg zat ditambahkan 1 mL larutan Pb (II) asetat 10 % dan 2 mL NaOH 6 N, segera terbentuk endapan warna kuning.
 3. Pemeriksaan Amin Aromatik Primer (Reaksi Diazo)
50 mg zat dilarutkan dalam 1 mL HCl 3 N, kemudian larutan direaksikan dengan 2 tetes pereaksi diazo I, kemudian dituangkan ke dalam 2 mL pereaksi diazo II, terbentuk warna merah jingga atau endapan (Autherhoff & Kovar, 1987).

C. Identifikasi Vitamin B₁ dengan Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi

Fase gerak yang digunakan adalah metanol: air: asam asetat: amoniak dengan perbandingan (5: 4,5: 0,5: 0,75) (Zebua, 2016), dan fase diam plat silika Gel 60 F₂₅₄. Larutan pembanding dan larutan uji ditotolkan sebanyak 2 µL pada plat yang sudah dipersiapkan. Amati bercak di bawah sinar UV 254 nm.

D. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi ditentukan dengan menganalisis beberapa tingkat konsentrasi dari larutan standar (100, 200, 300, 400, 500 ppm,) dan dilakukan penotolan standar tersebut pada plat dengan volume masing-masing 2 µL. Masing-masing larutan selanjutnya dielusi dengan metanol; air: asam asetat: amoniak dengan perbandingan (5: 4,5: 0,5: 0,75) dalam chamber. Kemudian diukur dengan densitometer sehingga didapatkan luas daerah dari masing-masing konsentrasi. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot luas area terhadap masing-masing konsentrasi larutan standar dengan menggunakan persamaan garis regresi linear ($y = a + bx$).

E. Penentuan Kadar Vitamin B₁ pada Sampel

Vitamin B₁ pembanding dan sampel larutan ditotolkan pada plat KLTKT. Selanjutnya bercak dideteksi dengan alat Camag TLC Scanner 4. Dari pengukuran didapat data luas area histogram dari larutan senyawa uji. Selanjutnya dihitung konsentrasi vitamin B₁ pada larutan uji dengan menggunakan persamaan linieritas dan dihitung kadar vitamin B₁.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kacang kedelai yang diambil di Pasar Raya Kota Padang. Sampel diekstraksi terlebih dahulu dengan menggunakan metode perendaman (maserasi) selama kurang lebih 1 jam. Pelarut yang digunakan pada proses perendaman adalah air suling 20 mL dan metanol 30 mL. Penambahan air suling tujuannya karena vitamin B₁ mudah larut dalam air, sedangkan metanol tujuannya untuk mempermudah identifikasi karena terdapat kesulitan dalam penggunaan air sebagai pelarut.

Identifikasi vitamin B₁ dilakukan dengan tiga pereaksi yang disajikan pada Tabel I. Dari ketiga identifikasi dengan reaksi warna menunjukkan bahwa ekstrak positif mengandung vitamin B₁. Pada reaksi warna digunakan 3 pereaksi yaitu tiokrom, timbal asetat, dan diazotasi. Reaksi tiokrom larutan sampel berfluoresensi biru ungu yang menandakan sampel mengandung vitamin B₁. Reaksi ini hanya dapat menentukan tiamin bebas dalam bahan pangan, karena hanya tiokrom bebas yang dapat diekstrak dengan pelarut organik (Andrawulan & Koswara, 1992).

Pada reaksi timbal asetat, pada larutan sampel terbentuk endapan warna kuning yang menandakan sampel mengandung vitamin B₁. Dalam hal ini

vitamin B₁ dapat rusak dalam suasana netral atau alkalis. Karena itulah ditambah dengan NaOH untuk membuat larutan dalam suasana basa. Disamping itu, vitamin B₁ terurai oleh zat-zat pengoksidasi dan dalam hal ini ditambahkan Pb asetat untuk mengoksidasi vitamin B₁ dan Pb²⁺ akan tereduksi menjadi Pb⁺ yang akhirnya akan mengendap sebagai endapan kuning.

Pada reaksi diazotasi, pada larutan sampel terbentuk warna merah jingga atau endapan yang menandakan

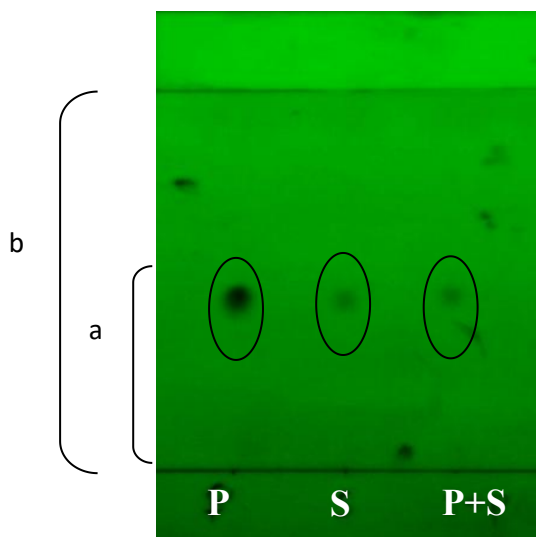
sampel mengandung vitamin B₁. Karena reaksi ini terjadi pada gugus 4-amino pada inti pirimidin, maka reaksi ini tidak memperhitungkan vitamin B₁ terdeaminasi atau tiokrom. Karena itu reaksi ini cukup tepat untuk menganalisis vitamin B₁ alami (Andrawulan & Koswara, 1992). Berdasarkan identifikasi yang sudah dilakukan maka membuktikan bahwa larutan sampel mengandung vitamin B₁ sesuai dengan literatur (Auterhooft & Kovar, 1987).

Tabel I. Data analisis kualitatif Vitamin B₁ dengan reaksi warna

Reaksi	Hasil Pengamatan	Persyaratan (Auterhooft & Kovar, 1987)	Kesimpulan
Tiokrom	Larutan biru	Larutan biru	Positif vitamin B ₁
Pereaksi Diazo	Endapan, larutan merah-jingga	Endapan, larutan merah-jingga	Positif vitamin B ₁
Timbal asetat	Endapan kuning	Endapan kuning	Positif vitamin B ₁

Analisa kualitatif dengan KLTKT juga menunjukkan keberadaan vitamin B₁ pada ekstrak. Hal ini ditunjukkan dengan terdapatnya noda pada plat dengan nilai *R_f* yang sama

dengan vitamin B₁ pembanding yaitu sebesar 0,5 (Gambar 1). Pada proses elusi hanya diperoleh satu noda pada sampel yang diduga bahwa sampel hanya mengandung satu komponen.



Gambar 1. Kromatogram sampel dan vitamin B₁ dengan menggunakan plat KLTKT

Keterangan:

a = jarak temuh noda

b = jarak tempuh pelarut

s = sampel

p = pembanding

p+s = pembanding + sampel

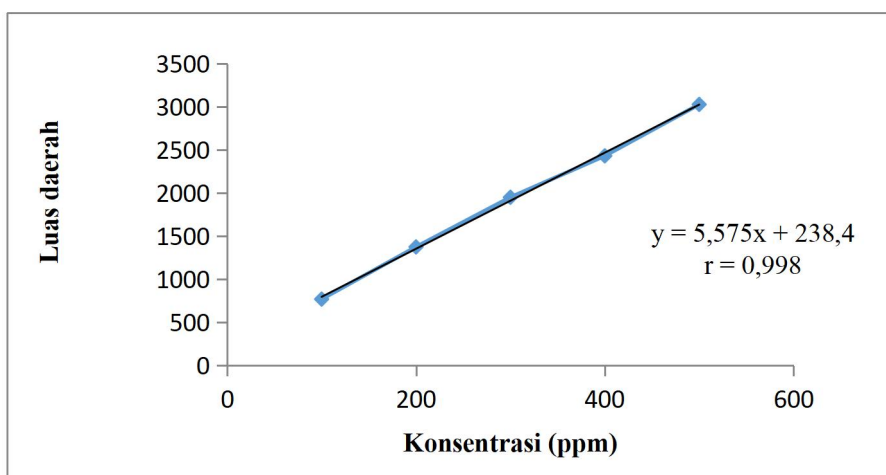
Tabel II. Data Kurva Baku Vitamin B₁

No.	Konsentrasi (ppm)	Luas daerah
1	100	769,2
2	200	1374,9
3	300	1951,1
4	400	2431,7
5	500	3028,6

Analisis kuantitatif dilakukan dengan metode densitometri menggunakan TLC *scanner* sehingga didapatkan luas daerah masing-masing konsentrasi seperti pada Tabel II.

Gambar 2 menunjukkan kurva kalibrasi vitamin B₁ dengan persamaan

regresi $y = 238,4 + 5,575x$ dengan koefisien korelasi (r) 0,998. Kurva kalibrasi yang didapatkan linier karena nilai (r) berada pada rentang $0,995 \leq r \leq 1$ (Harmita, 2006).



Gambar 2. Kurva linearitas vitamin B₁

Berdasarkan data kurva kalibrasi, selanjutnya dilakukan penetapan kadar

vitamin B₁ pada kacang kedelai (Tabel III).

Tabel III. Data kadar Vitamin B₁ pada kacang kedelai

Pengulangan	Luas daerah	Konsentrasi (ppm)	% Kadar vitamin B ₁	SD
I	983,2	133,5964	0,06679	0,002363
II	817,7	103,9103	0,05195	
III	920,9	122,4215	0,06119	
Σ	2721,8	359,9282	0,17999	
Rata-rata	907,27	119,9761	0,0599	

Dari hasil penelitian didapatkan rata-rata konsentrasi vitamin B₁ pada kacang kedelai adalah 119,9761 ppm dengan % kadar rata-rata adalah 0,0599 % dengan nilai SD \pm 0,002363. Kebutuhan sehari vitamin B₁ adalah 1,0 mg/hari sedangkan dalam 100 g kacang kedelai mengandung 60 mg vitamin B₁. Sehingga kebutuhan vitamin B₁ terpenuhi dengan mengkonsumsi kacang kedelai.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh kadar rata-rata vitamin B₁ pada kacang kedelai adalah 0,0599 \pm 0,002363 % .

DAFTAR RUJUKAN

- Andrawulan. N. & Koswara. S. (1992). *Kimia Vitamin*. (Edisi 1). Bogor: Penerbit Universitas Pangan Dan Gizi Institut Pertanian Bogor.
- Brumm, T.J., Louis, M.O., & Hurburgh, C. R. Jr. (2002). Quality of the 2002 soybean crop from the United States. *Journal American Soybean Association*
- Carrao-Panizzi, M. C., Fvoni, S. P. G., & Kikuchi, A. (2002). Extraction time for isoflavone determination. *Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45, 4, 515-8.
- Hardman, J. G. & Limbird. L, E. (2012). *Dasar Farmakologi dan Terapi*. Penerjemah tim ahli bahasa sekolah farmasi ITB. Bandung: Penerbit buku kedokteran (EGC). I).Jakarta: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Pitojo, S.(2003). *Benih kedelai*. Yogyakarta: Kanisius (Anggota IKAPI).
- Harmita. (2006). *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi* (Edisi
- Suhardi., Sudjoko, S. A., Minarningsih., Sabarnurdin, S., D, D. H., & Widodo, A. (2002). *Hutan dan Kebun sebagai Sumber Pangan Nasional*. Yogyakarta : Kanisius.
- Wang, H. & Murphy, P (1994) Isoflavon Composition of America and Japanese soybean in Iowa: Effect of Variety Crop Year and Location. *J of Agri and Food Chem*, 42, 674-1677.
- Watson, D. G. (1999). *Analisis Farmasi Buku Ajar untuk Mahasiswa Farmasi dan Praktisi Kimia Farmasi* (Edisi 2). Penerjemah: W. R. Syarief. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Zebua, S. (2016). *Evaluasi penggunaan plat kromatografi lapis tipis silica gel GF 60 dan plat kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi silica gel 60 F₂₄₅ pada penentuan kadar vitamin B₁ pada beras putih*. (Skripsi). Padang: Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Padang.