5,2 dengan asam asetat glasial. Jika perlu, lakukan penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Pada 20 mg standar riboflavin, tambah 180 ml larutan pengekstrak dan panaskan selama 5 menit dalam penangas air pada suhu 65°—75°C dan aduk. (Jika diperlukan ulangi proses tersebut sampai larut). Dinginkan dalam air dingin pada suhu ruang, encerkan dengan larutan pengekstrak sampai batas volume 2000 ml dan aduk.

Larutan standar. Encerkan 5 ml larutan stok standar dengan larutan pengekstrak sampai volume 25 ml dan aduk.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin, metode 2.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek larutan standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi riboflavin dalam larutan standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B₁ (tiamin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Larutkan 1,88 g natrium 1-heksan-sulfonat dalam 1000 ml asam fosfat (0,1%). Campur larutan dengan asetonitril (92:18). Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar tiamin hidroklorida dalam asam hidroklorida 0,2 M sampai konsentrasi 0,1 mg/ml.

Larutan standar. Encerkan 5 ml larutan stok standar dengan asam hidroklorida 0,2 M sampai volume 25 ml.

Larutan uji. Larutkan sediaan setara dengan 2 mg tiamin dalam 100 ml asam hidroklorida 0,2 M, aduk selama 15 menit dan didihkan selama 30 menit. Dinginkan pada suhu ruang, dan saring. Gunakan saringan.

Kolom. Okatadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus:

$$100 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi tiamin dalam larutan standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium dan seng

Lakukan dengan metode seperti yang tertera pada vitamin larut lemak, air dan mineral tablet.

Penyimpanan

Disimpan dalam wadah, tertutup rapat dan terlindung dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi, 2) Jenis sediaan, 3) Indikasi, 4) Waktu kadaluwarsa, 5) Kondisi penyimpanan.

Vitamin Larut Air, Lemak dan Mineral Serbuk Oral

Definisi

Vitamin larut air, lemak dan mineral dalam sediaan serbuk oral mengandung dua atau lebih vitamin larut lemak yaitu : vitamin A, vitamin D sebagai ergokalsiferol (vitamin D₂) atau kolekalsiferol (vitamin D₃), vitamin E, fitonadion (vitamin K₁), β-karotin; dan satu atau lebih vitamin yang dapat larut dalam air yaitu: asam askorbat atau setara dengan kalsium askorbat atau natrium askorbat, biotin, sianokobalamin, asam folat, niasin atau niasinamid, asam pantotenik (sebagai kalsium pantotenat atau rasemik kalsium pantotenat), piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; dan satu atau lebih mineral dilengkapi dengan satu atau lebih unsur-unsur berikut dalam ionisasi : kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium, dan seng serta dapat mengandung zat lain yang tertera dalam etiket dengan jumlah yang akurat.

Serbuk oral memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan serbuk oral dan persyaratan berikut:

Mengandung tidak kurang dari 80,0% dari jumlah yang tertera pada etiket untuk vitamin A (C₂₀H₃₀O) sebagai retinol atau ester retinol dalam bentuk retinil asetat

(C₂₂H₃₂O₂) atau retinil palmitat (C₃₆H₆₀O₂), vitamin D sebagai kolekalsiferol (C₂₇H₄₄O) atau ergokalsiferol (C₂₈H₄₄O), vitamin E sebagai α-tokoferol (C₂₉H₅₀O₂) atau α-tokoferil asetat (C₃₁H₅₂O₃) atau α-tokoferil suksinat (C₃₃H₅₄O₅), fitonadion (C₃₁H₄₆O₂), dan β-karotin (C₄₀H₅₆) tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera dalam etiket untuk asam askorbat (C₆H₈O₆) atau garamnya sebagai kalsium askorbat (C₁₂H₁₄CaO₁₂·2H₂O) atau natrium askorbat (C₆H₇NaO₆), biotin (C₁₀H₁₆N₂O₃S), sianokobalamin (C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P), asam folat (C₁₉H₁₉N₇O₆), niasin (C₆H₅NO₂), atau niasinamid (C₆H₆N₂O), kalsium pantotenat (C₁₈H₃₂CaN₂O₁₀), piridoksin hidroklorida (C₈H₁₁NO₃·HCl), riboflavin (C₁₇H₂₀N₄O₆), dan tiamin (C₁₂H₁₇CIN₄OS) sebagai tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; kalsium (Ca), tembaga (Cu), besi (Fe), magnesium (Mg), mangan (Mn), fosfor (P), kalium (K), dan seng (Zn); kromium (Cr), fluorin (F), iodium (I), molibdenum (Mo), dan selenium (Se).

Identifikasi

Lakukan dengan cara seperti yang tertera pada penetapan kadar.

Penetapan kadar

Vitamin A (retinol)

Lakukan dengan salah satu metode dibawah beriku:

1. Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan:

Asam sulfat-metanol 3 M. Tambah dengan hati-hati 9 ml asam sulfat ke dalam 80 ml metanol dalam labu -100 ml. Dinginkan, dan encerkan dengan metanol sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Natrium askorbat-pirogallol. Pada 10 g natrium askorbat dan 5 g pirogallol, tambah air sampai larut. Tambah 1,7 ml asam sulfat, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml.

Lesitin. Larutkan dan encerkan 0,5 g lesitin dengan 2,2,4-trimetilpentan sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Fase gerak. Campuran n-heksan dan etil asetat (99,7:0,3).

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar vitamin A (retinil asetat) dalam 2,2,4-trimetilpentan sampai konsentrasi 15 µg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan sediaan retinil palmitat dalam 2,2,4-trimetilpentan sampai konsentrasi 15 µg/ml. Campur larutan dengan larutan standar sampai masing-masing konsentrasi 7,5 µg retinil asetat/ml dan 7,5 µg retinil palmitat/ml.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 30 µg kolekalkiferol atau ergokalkiferol atau setara dengan 90 mg vitamin E (sebagai α-tokoferol, α-tokoferil asetat, atau α-tokoferil hemisuksinat) atau setara dengan 2,5 mg retinil asetat atau retinil palmitat. Tambah 0,5 g natrium bikarbonat, 1,5 ml lesitin, dan 12,5 ml 2,2,4-trimetilpentan, aduk. Tambah 6 ml larutan natrium askorbat-pirogallol, aduk, dan biarkan larutan sampai gas keluar. Lanjutkan

pengadukan sampai evolusi gas telah berhenti, aduk kembali selama 12 menit. Tambahkan 6 ml dimetilsulfoksida, aduk sampai terbentuk suspensi, dan aduk selama 12 menit. Tambahkan 6 ml larutan asam sulfat-metanol 3 M, campur sampai terbentuk suspensi, dan aduk selama 12 menit. Tambahkan 12,5 ml 2,2,4-trimetilpentan, aduk sampai terbentuk suspensi, dan kocok selama 10 menit. Sentrifus selama 10 menit untuk memecahkan emulsi dan supernatan menjadi jernih. [supernatant untuk penetapan kadar vitamin A, D dan E]. Jika diperlukan, larutkan supernatan dengan 2,2,4-trimetilpentan sampai diperoleh konsentrasi setara dengan larutan standar.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 325 nm.

Kolom. Polimer vinil, 5 µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

Laju alir. 1,5 m per menit.

Kesesuaian sistem. Resolusi, antara retinil asetat dan retinil palmitat tidak kurang dari 8,0; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 40 µL larutan standar dan larutan uji dan ukur area puncak untuk retinil asetat yang diperoleh dari larutan standar dan area puncak untuk retinil asetat atau retinil palmitat yang diperoleh dari larutan uji. Hitung kadar (mg) dari vitamin A, sebagai retinil dengan rumus :

$$26,5 \text{ ECD} \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

E = faktor konversi untuk retinil asetat dari vitamin A

0,872 = faktor

C = konsentrasi vitamin A standar (mg/ml)

D = faktor pelarut (ml), digunakan untuk persiapan larutan uji dari supernatan

A_s = area puncak all-trans retinil ester diperoleh dari larutan uji

A_{Std} = area puncak all-trans retinil ester diperoleh dari standar

2. Lakukan dengan kromatografi cair menggunakan:

Larutan pengestrak. Campur n-heksan dan metilen klorida (3:1).

Kalium hidroksida. Larutkan 80 g kalium hidroksida dalam 100 ml air, aduk, dan dinginkan.

Larutan pengencer. Larutkan 1 g pirogallol dalam alkohol sampai batas volume volume 100,0 ml dan aduk.

Fase gerak. Campuran n-heksan dan isopropil-alkohol (92 : 8). Jika diperlukan lakukan penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan sediaan vitamin A dalam larutan pengencer sampai konsentrasi 30 µg/ml. Larutan disimpan dalam lemari pendingin selama 1 minggu.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar dengan larutan pengencer sampai konsentrasi 1 µg/ml vitamin A. Pada 10 ml larutan, tambah 5 ml air, 5 ml larutan pengencer dan 3 ml larutan kalium hidroksida. Aduk selama 15 menit di atas penangas air dengan suhu $6^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$, dan dinginkan dalam suhu ruang. Tambah 7 ml air dan 25 ml larutan pengeksrak. Aduk selama 60 detik. Bilas labu dengan 60 ml air, biarkan selama 10 menit sampai lapisan terpisah. Larutan standar mengandung 0,34 µg/ml retinol.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 1,5 mg retinil asetat, tambah 5 ml air, 15 ml larutan pengencer dan 3 ml larutan kalium hidroksida. Aduk selama 15 menit di atas penangas air dengan suhu $6^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ dan dinginkan pada suhu ruang. Tambah 7 ml air dan 25 ml larutan pengeksrak. Aduk selama 60 detik atau lebih. Bilas labu dengan 60 ml air, dan biarkan selama 10 menit sampai lapisan terpisah. [Jangan dikocok, saat emulsi terbentuk]. Encerkan sebagian lapisan organik dengan larutan pengeksrak sampai konsentrasi 0,34 µg/ml (retinol).

Kolom. Silika gel, 5 µm, ukuran 8,0 cm x 6,2 mm, atau yang sesuai dengan suhu 40°C.

Laju alir. 4 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 335 nm.

Injek 50 µl larutan standar dan larutan uji ke dalam kromatograf. Hitung kadar (mg), dari vitamin A, sebagai retinol dengan rumus :

$$0.872 CD \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

0,872 = faktor konversi untuk retinil asetat, dari standar vitamin A

C = konsentrasi vitamin A standar (mg/ml)

D = faktor pelarut (ml) digunakan untuk larutan uji

A_s = jumlah area puncak all-trans retinol dan 13-cis retinol yang dari larutan uji

A_{Std} = area puncak all-trans retinil asetat yang diperoleh dari larutan standar

Vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campuran n-heksan dan isopropil-alkohol (99 : 1). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutkan standar kolekalsiferol atau ergokalsiferol dalam n-heksan sampai konsentrasi 2 µg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Panaskan larutan standar dengan suhu 60° selama 1 jam untuk

mendapatkan isomer vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol) sebagai prekursor.

Larutan uji. Uapkan 20 ml larutan, yang diperoleh pada penetapan kadar vitamin A (metode 1) sampai konsentrasi 2 µg/ml (kolekalsiferol atau ergokalsiferol).

Kolom. Aminopropilsilil 10 µm, ukuran 15 cm x 4,6 mm.

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 265 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara vitamin D yang terbentuk dan prekursor tidak kurang dari 10; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dari kolekalsiferol atau ergokalsiferol dengan rumus:

$$1,09 CD \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

1,09 = faktor-koreksi untuk menghitung jumlah previtamin D yang ada dalam sediaan

C = konsentrasi kolekalkiferol dan ergokalkiferol pada larutan standar (µg/ml)

D = faktor pelarut (ml) untuk larutan uji

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan :

Asam sulfat-metanol 3 M. Tambah dengan hati-hati 9 ml asam sulfat dalam 80 ml metanol. Dinginkan, dan encerkan dengan metanol sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Natrium askorbat-pirogallol. Pada 10 g natrium askorbat dan 5 g pirogallol, tambah air sampai larut. Tambah 1,7 ml asam sulfat, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml.

Lesitin. Larutkan dan encerkan 0,5 g lesitin dengan 2,2,4-trimetilpentan sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Fase gerak. Campur n-heksan dan butanol (98,75 : 1,25). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem (kromatografi)).

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar kolekalsiferol atau standar ergokalsiferol dalam 2,2,4-trimetilpentan sampai konsentrasi 1 µg/ml .

Larutan kesesuaian sistem. Panaskan larutan standar pada suhu 60° selama 1 jam untuk mendapatkan isomer vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol) sebagai prekursor.

Kolom. Polimer vinil gel, 5-µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

Laju alir. 1 ml/menit.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara vitamin D

yang terbentuk dan prekursor tidak kurang dari 10; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dari kolekalsiferol atau ergokalsiferol dengan rumus :

$$26,5 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi kolekalsiferol atau ergokalsiferol larutan standar (µg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

3. Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan:

Asam asetat encer. Encerkan 10 ml asam asetat glasial dengan air sampai batas volume 100,0 ml.

Larutan fenolftalein. Fenolftalein (1 g per 100 ml alkohol).

Larutan kalium hidroksida-alkohol. Larutkan 14 g kalium hidroksida dalam campuran 31 ml alkohol anhidrat dan 5 ml air. Larutan harus segar.

Larutan pengekstrak. Campuran metilen klorida dan isopropil alkohol (99,8:0,2).

Fase gerak. Cambur asetonitril dan metanol (91:9). Jika diperlukan, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan kolekalsiferol atau ergokalsiferol dalam alkohol anhidrat sampai konsentrasi 0,2 mg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan standar. [Kondisikan kolom ekstraksi fasa-padat dengan cara bilas kolom dengan 4 ml campuran metilen klorida dan isopropil alkohol (80:20), kemudian dengan 5 ml larutan pengekstrak. Jangan biarkan kolom kering]. Encerkan larutan stok standar dengan alkohol anhidrat sampai konsentrasi 5 µg/ml. Pada 2 ml larutan, tambah 15 ml air dan 15 ml larutan kalium hidroksida-alkohol, sumbat, aduk selama 30 menit dalam penangas air 60°C. Dinginkan pada suhu ruang dan pindahkan ke dalam labu pisah-250 ml. Tambah 15 ml air, aduk dan pindahkan larutan ke dalam labu pisah kedua, tambah 60 ml n-heksan dan aduk selama 15 menit. Buang lapisan air. Pada fase heksan, tambah 1 tetes fenolftalein, 15 ml air, dan asam asetat encer perlahan-lahan sampai netral. Biarkan selama 10 menit sampai lapisan terpisah dan buang lapisan air. Saring fase heksan dengan natrium sulfat anhidrat ke dalam botol 100 ml. Bilas penyaring dengan n-heksan dan campur hasil bilasan dalam botol yang sama. Uapkan fase heksan dengan rotavapor pada suhu 50°C sampai kering. Larutkan residu dengan 2 ml larutan pengekstrak dan alirkan ke dalam kolom silika ekstraksi fasa-padat (*solid phase extraction silica*). Elusi kolom dengan 10 ml larutan pengekstrak dan buang 1 ml eluat pertama, kemudian tampung eluat berikutnya. Hangatkan di atas penangas air pada suhu 42°C dan uapkan

dengan aliran nitrogen. Larutkan residu dengan 2 ml asetonitril.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 10 µg kolekalsiferol atau ergokalsiferol, lakukan dengan cara yang sama seperti larutan standar, dimulai dengan "...tambah 15 ml air dan 15 ml larutan kalium hidroksida-alkohol".

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai, suhu 27°C.

Laju alir. 0,7 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 265 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara vitamin D yang terbentuk dan prekursor tidak kurang dari 10. dan simpangan baku relatif untuk tidak lebih dari 4%.

Injek 15 µl larutan standar dan larutan uji. Hitung kadar (µg) dari kolekalsiferol atau ergokalsiferol dengan rumus :

$$1,09 (2C) \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

1,09 = faktor-koreksi untuk menghitung jumlah previtamin D

C = konsentrasi larutan standar (µg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Vitamin E (α-tokoferol, α-tokoferil asetat, atau α-tokoferil suksinat)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Encerkan 10 ml asam fosfat dengan air sampai batas volume 1000 ml (larutan A). Campur metanol dan larutan A (95:5). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutkan sediaan α-tokoferol, α-tokoferil asetat, atau α-tokoferil suksinat dalam metanol sampai konsentrasi 2 mg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan standar ergokalsiferol dalam metanol sampai konsentrasi 0,65 mg/ml. Pindahkan 1 ml larutan ke dalam labu yang mengandung 100 mg α-tokoferil asetat. Larutkan dengan 30 ml metanol dan aduk. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan uji. Uapkan 20 ml larutan (yang diperoleh pada penetapan vitamin A). Metode 1 pada suhu ruang dengan vakum sampai kering. Larutkan dan encerkan residu dengan metanol sampai konsentrasi 2 mg/ml.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, 10 cm x 8 mm.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Kesesuaian sistem. Waktu tambat relatif 0,5 untuk ergokalsiferol dan 1,0 untuk α -tokoferil asetat; resolusi antara ergokalsiferol dan α -tokoferil asetat tidak kurang dari 12; dan faktor tailing antara 0,8 dan 1,2. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injeksi 100 μ l larutan standar dan larutan uji. Hitung kadar (μ g) dengan rumus:

$$CD \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

- C = konsentrasi standar (mg/ml)
 D = faktor pelarut (ml) untuk larutan uji
 A_S = area puncak larutan uji
 A_{Std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campur 240 ml metanol, 10 ml air, 0,5 ml asam fosfat 50%, encerkan dengan asetonitril sampai batas volume 1000 ml, aduk dan saring. Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan dan encerkan sediaan α -tokoferol, α -tokoferil asetat, dan α -tokoferil suksinat dalam metanol sampai konsentrasi 2 mg/ml.

Larutan standar. Larutan dan encerkan standar α -tokoferol, α -tokoferil asetat, atau α -tokoferil suksinat dalam metanol sampai konsentrasi 2 mg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam penetapan vitamin A, Metoda 2. Pindahkan supernatant 2,2,4-trimetilpentan ke dalam labu sampai konsentrasi setara dengan larutan standar. Uapkan sampai kering, tambah metanol, dan uapkan sisa 2,2,4-trimetilpentan. Encerkan dengan metanol dan aduk.

Kolom. Oktadesilsilil 5 μ m, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

Kesesuaian sistem. Waktu tambat relatif 0,6 untuk α -tokoferil suksinat, 0,8 untuk α -tokoferol, dan 1,0 untuk α -tokoferil asetat, berturut-turut; resolusi antara α -tokoferil suksinat dan α -tokoferol tidak kurang dari 4,0; dan resolusi antara α -tokoferol serta α -tokoferil asetat tidak kurang dari 3,0. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injeksi 25 μ l larutan standar dan larutan uji. Hitung kadar (μ g) dengan rumus :

$$26,5 CD \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

- C = konsentrasi standar (mg/ml)
 D = faktor pelarut sebagai pengganti pelarut 2,2,4-trimetilpentan menjadi metanol

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

[Ekstraksi awal pada 26,5 ml 2,2,4-trimetilpentan telah dibukukan dalam rumus] Hitung α -tokoferol setara dengan α -tokoferil asetat atau α -tokoferil suksinat dengan cara mengalikan jumlah (mg), oleh faktor 0,91 atau 0,81.

3. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut. Campuran asetonitril dan etil asetat (1:1).

Fase gerak. Campuran metanol, asetonitril, dan n-heksan (46,5 : 46,5 : 7,0). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutan dan encerkan standar α -tokoferol, α -tokoferil asetat, atau α -tokoferil suksinat dalam metanol sampai konsentrasi 0,3 mg/ml.

Larutan uji. Sediaan setara dengan 8 mg α -tokoferol, ke dalam labu-125 ml. Tambah 25 ml air, 25 ml alkohol dehidrat dan 3,5 g kalium hidroksida. Aduk selama 1 jam dalam penangas air 55°C, dinginkan, dan pindahkan dengan bantuan 50 ml n-heksan ke dalam labu pisah-125 ml dan kocok selama 60 detik sampai lapisan terpisah. Pindahkan lapisan air ke dalam labu pisah-250 ml kedua, dan ulangi ekstraksi dengan 50 ml n-heksan. Buang lapisan air dan gabungkan ekstrak heksan. Bilas ekstraksi dengan 25 ml air sampai lapisan terpisah, dan buang lapisan air. Tambah 3 tetes asam asetat glasial dan ulangi prosedur pembilasan sebanyak 2 kali. Saring hasil bilasan lapisan heksan dengan natrium sulfat anhidrat ke dalam botol-250 ml. Bilas corong dan natrium sulfat dengan n-heksan dan tambah hasil bilasan ke dalam larutan heksan dalam botol. Uapkan larutan heksan dalam penangas air pada suhu 50°C sampai kering. Segera tambah 25,0 ml pelarut dan aduk sampai residu larut.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai, suhu 40°C.

Laju alir. 3 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 291 nm.

Simpangan baku relatif. Tidak lebih dari 5%.

Injeksi 20 μ l larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (μ g) dengan rumus:

$$25 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

- C = konsentrasi standar (mg/ml)
 A_S = area puncak larutan uji
 A_{Std} = area puncak larutan standar

Vitamin K₂ (fitonadion)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campuran metanol dan air (95:5). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan sediaan dalam metanol sampai konsentrasi 200 µg/ml (fitomenadion), jika perlu dengan bantuan sonikasi.

Larutan standar. Encerkan 10 ml larutan stok standar dengan metanol sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan 65 mg α-tokoferil asetat dengan 75 ml metanol, tambah 10 ml larutan stok standar, encerkan dengan metanol sampai batas volume 100 ml.

Larutan uji. Uapkan 20 ml larutan (yang diperoleh pada penetapan vitamin A, metode 1), pada suhu ruang dengan vakum sampai mendekati kering. Larutkan dan encerkan residu dengan metanol sampai konsentrasi fitomenadion 20 µg/ml.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 10 cm x 8 mm.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara α-tokoferil asetat dan fitonadion tidak kurang dari 5. Waktu retensi relatif 0,68 untuk α-tokoferil asetat dan 1,0 untuk fitonadion dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$C(LD) \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi standar sediaan (µg/ml)

L = jumlah fitomenadion pada sediaan (µg)

D = konsentrasi fitomenadion dalam larutan uji (µg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar.

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut. Campuran metanol dan isopropanol (95:5).

Fase gerak. Campuran 800 ml metanol, 200 ml metilen klorida, 0,1 ml asam asetat glasial, 1,36 g seng klorida, dan 0,41 g natrium asetat.

Larutan standar internal. Larutkan menakuinon 4 (vitamin K₂) dalam pelarut sampai konsentrasi 5 µg/ml. [Stok larutan menakuinon 4 (100 µg/ml) dapat disimpan selama 2 bulan dalam lemari pendingin.]

Larutan stok standar. Larutkan sediaan fitonadion dalam metilen klorida dengan bantuan sonikasi. Encerkan dengan pelarut sampai konsentrasi 5 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan 1 ml larutan stok standar dan 1 ml larutan standar internal dengan pelarut sampai volume 5,0 ml dan aduk. Saring dengan membran 0,45 µm atau yang sesuai.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 50 µg fitonadion, tambah 4 ml air, sumbat, dan aduk. Tempatkan tabung dalam penangas air pada suhu 60°C selama 5 menit. Buang rendaman dan aduk selama 1 menit biarkan larutan tetap panas. Tambah 8 ml alkohol dan aduk. Tempatkan tabung dalam penangas air pada suhu 60°C selama 5 menit. Buang rendaman, dan aduk selama 2 menit biarkan larutan tetap panas. Dinginkan pada suhu ruang. Encerkan dengan larutan standar internal setara dengan 5 µg/ml fitonadion. Tambah 20 ml petroleum benzin dan sumbat. Aduk selama 15 menit. Sentrifus untuk memisahkan kedua lapisan. Pindahkan lapisan atas dari petroleum benzin setara dengan 5—50 µg fitonadion ke dalam labu. Uapkan tabung dalam penangas air pada suhu 35°—45°C dengan aliran nitrogen sampai lemak residu hilang. Larutkan residu dalam pelarut sampai konsentrasi 1 µg/ml fitomenadion.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Paska kolom. Serbuk seng, ukuran 3 cm x 4,6 mm atau yang sesuai. [Siapkan reaktor paska kolom jika diperlukan atur kesesuaian sistem].

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Fluorometri pada panjang Ex. 320 nm untuk Em. 420 nm untuk emisi.

Kesesuaian sistem. Waktu tambat relatif 1,0 untuk standar internal dan 1,4 untuk fitonadion; efisiensi kolom untuk puncak fitonadion tidak kurang dari 2500 plat teoritis; faktor tailing untuk puncak fitonadion tidak lebih dari 1,5; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 25 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$SCD \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi standar (µg/ml)

D = volume larutan standar internal yang digunakan untuk larutan uji (ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

β-Karoten

Lakukan dengan metode spektromotometer, menggunakan:

Larutan kalium hidroksida. Larutkan dan encerkan 58,8 g kalium hidroksida dalam air sampai batas volume 50 ml.

Larutan iodium. Larutkan 10 mg iodium dengan sikloheksan dan aduk. Encerkan 10 ml larutan dengan sikloheksan sampai batas volume 100 ml dan aduk. Larutan harus segar.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 2 mg β -karoten, tambah 100 ml alkohol, 6 ml larutan kalium hidroksida dan aduk. Panaskan dengan refluks kondensor selama 45 menit. Dinginkan pada suhu ruang, tambah 170 ml larutan heksan dan aduk selama 30 menit. Biarkan selama 5—10 menit. Pindahkan lapisan organik ke dalam labu 500 ml. Pada lapisan air, tambah 170 ml heksan dan aduk selama 20 menit. Biarkan selama 10 menit. Buang lapisan air dan campur lapisan organik. Pada fase organik, tambah 3 g natrium sulfat anhidrat dan aduk. Pindahkan larutan setara dengan 100 μ g β -karoten ke dalam labu -50 ml. Uapkan dengan aliran nitrogen sampai kering dan segera tambah sikloheksan. Tambah 2 ml larutan iodium dan panaskan selama 15 menit dalam penangas air pada suhu 65°C. Dinginkan dan encerkan dengan sikloheksan aduk.

Ukur serapan pada panjang gelombang maksimum 452 nm, gunakan sikloheksan sebagai blanko. Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$LD \left(\frac{A_s}{223} \right)$$

Keterangan :

- L = jumlah β -karoten pada sediaan (mg)
 D = konsentrasi β -karoten pada larutan uji (mg/ml)
 A_s = serapan larutan uji
 223 = serapan β -karoten pada panjang gelombang 452 nm

Asam askorbat, kalsium askorbat dan natrium askorbat

Pada sediaan setara dengan 100 mg asam askorbat, tambah 75 ml asam metafosfat asetat. Sumbat dan aduk selama 30 menit. Encerkan dengan air dan aduk. Sentrifus sampai supernatan. Pada 4 ml larutan, tambah 5 ml asam metafosfat-asetat dan titrasi dengan larutan standar diklorofenol-indofenol sampai warna merah muda tetap selama 5 detik. Standarisasi larutan diklorofenol-indofenol dengan campuran 5,5 ml asam metafosfat-asetat dan 15 ml air.

Vitamin H (biotin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Larutan uji. Larutkan sediaan setara dengan 1 mg biotin dalam 3 ml dimetil sulfoksida, hangatkan di atas penangas air pada suhu 60°—70°C selama 5 menit. Sonikasi selama 5 menit dan encerkan dengan air sampai batas volume 200 ml.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan 67 mg standar biotin dalam dimetilsulfoksida sampai batas volume 200 ml. Encerkan larutan dengan air sampai konsentrasi 5 μ g/ml.

Kolom. Oktilsilil, 3- μ m ukuran 15 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

Fase gerak. Campur 85 ml asetonitril, 1 g natrium

perklorat, dan 1 ml asam fosfat, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, aduk, saring. Jika perlu buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Laju alir. 1,2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 200 nm.

Sistem kromatografik. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 100 μ l larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (μ g) dengan rumus :

$$200 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi biotin pada larutan standar (μ g/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode mikrobiologi menggunakan:

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar biotin dalam alkohol 50% sampai konsentrasi 50 μ g/ml dan aduk. Simpan larutan dalam lemari pendingin.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar dengan air sampai konsentrasi 0,1 ng/ml.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 100 μ g biotin, tambah 3 ml alkohol 50%, dan aduk. Panaskan dalam penangas air pada suhu 60°—70°C selama 5 menit. Sonikasi selama 5 menit, encerkan dengan alkohol 50% sampai batas volume 200 ml dan saring. Encerkan larutan dengan air sampai konsentrasi 0,1 ng/ml.

Larutan asam-kasein hidrolisat. Campurkan 100 g vitamin bebas kasein dengan 500 ml asam hidroklorida 6M dan refluks selama 8—12 jam. Suling dengan pengurangan tekanan (untuk menghilangkan asam hidroklorida) sampai terbentuk pasta. Larutkan pasta dalam air, atur pH 3,5 $\pm$ 0,1 dengan natrium hidroksida 1 M dan tambah air sampai batas volume 1000 ml. Tambah 20 g arang aktif, aduk selama 1 jam dan saring ke dalam botol. Ulangi proses dengan arang aktif. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

Larutan sistin-triptofan. Suspensikan 4,0 g L-sistin dalam 1,0 g L-triptofan (atau 2,0 g D,L-triptofan) dalam 700 ml air, panaskan pada suhu 70°—80°C, dan tambah secara perlahan larutan asam hidroklorida (1 dalam 2), aduk. Dinginkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

Larutan urasil-guanin-adenin. Larutkan 200 mg adenin sulfat, guanin hidroklorida, dan urasil dalam 10 ml asam hidroklorida 4M sambil dipanaskan, dinginkan, dan tambah air sampai batas volume 200 ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan polisorbitat 80. Larutkan dan encerkan 25 g polisorbitat 80 dalam alkohol sampai batas volume 250 ml.

Larutan kalsium pantotenat. Larutan kalsium pantotenat dalam alkohol 50% yang mengandung 10 µg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan riboflavin-tiamin hidroklorida. Larutan riboflavin dan tiamin hidroklorida dalam asam asetat 0,02 M yang mengandung 20 µg/ml riboflavin dan 10 µg/ml tiamin hidroklorida. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih 10°C.

Larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida. Campuran air dan alkohol netral (3:1) yang mengandung 10 µg/ml asam p-aminobenzoat, 50 µg/ml niasin dan 40 µg/ml piridoksin hidroklorida. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan garam 1. Larutkan dan encerkan 25 g kalium fosfat dan 25 g dikalium fosfat dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

Larutan garam 2. Larutkan dan encerkan 10 g magnesium sulfat, 0,5 g natrium klorida, 0,5 g besi sulfat dan 0,5 g mangan sulfat dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

Larutan basal stok medium. Campur 25 ml larutan asam-kasein hidrolisat, 25 ml larutan sistin-triptofan, 0,25 ml larutan polisorbitat 80, 10 g dekstrosa anhidrat, 5 g natrium asetat anhidrat, 5 ml larutan urasil-guanin-adenin, 5 ml larutan kalsium pantotenat, 5 ml larutan riboflavin-tiamin hidroklorida, 5 ml larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida, 5 ml larutan garam (1), 5 ml larutan garam (2), atur pH $6,8 \pm 0,1$ dengan natrium hidroksida 1 M dan encerkan dengan air sampai batas volume 250 ml.

Stok kultur *Lactobacillus plantarum*. Larutkan 2 g sari ragi dalam 100 ml air, tambah 500 mg dekstrosa anhidrat, 500 mg natrium asetat anhidrat dan 1,5 g agar. Panaskan campuran di atas penangas air dengan pengadukan sampai agar larut. Pindahkan 10 ml larutan panas pada tabung uji, sumbat, sterilkan pada otoklaf 121°C dan biarkan tabung sampai dingin dalam posisi tegak lurus. Siapkan kultur pada tiga atau lebih tabung, gunakan kultur murni *Lactobacillus plantarum*, inkubasi selama 16–24 jam pada suhu 30°–37°C dan tetap pada suhu $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Simpan dalam lemari pendingin. Siapkan stok kultur segar setiap minggunya dan jangan gunakan untuk inokulum jika kultur lebih dari 1 minggu.

Medium kultur. Setiap tabung uji mengandung 5 ml larutan basal stok medium, tambah 5 ml air yang mengandung 0,5 mg biotin. Sumbat dengan katun, sterilkan dengan otoklaf 121°C dan dinginkan.

Inokulum. [Suspensi beku *Lactobacillus plantarum* dapat digunakan sebagai stok kultur untuk menghasilkan inokulum yang sebanding dengan

kultur segar]. Pindahkan secukupnya dari stok kultur *Lactobacillus plantarum* ke dalam tabung steril yang mengandung 10 ml medium kultur. Inkubasi pada suhu 30°–37°C selama 16–24 jam.

Prosedur. Siapkan enam tabung, tambah larutan standar ke setiap tabung yang berbeda masing-masing 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ml. Pada setiap tabung dan empat tabung kosong lain, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml. Pada empat tabung yang kosong, tambahkan larutan uji 2–3 kali larutan standar termasuk 2,0; 3,0; dan 4,0 ml. Pada setiap tabung, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml. Sumbat semua tabung, sterilkan pada otoklaf 121°C selama 5 menit. Dinginkan, tambah 1 tetes inokulum pada setiap tabung, kecuali dua dari empat tabung tidak mengandung larutan standar (blanko) dan aduk. Inkubasi pada suhu 30°–37°C selama 16–24 jam inkubasi. Dalam 2 jam pertama tidak terjadi kekeruhan dalam tabung yang mengandung standar dengan konsentrasi paling tinggi.

Ukur %T masing-masing tabung dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540–660 nm.

Perhitungan. Lakukan perhitungan dengan bantuan kurva konsentrasi-respon (%T) atau dengan bantuan program yang tersedia pada peralatan.

- Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Dapar. Pada 800 ml air dan 100 ml tritilamin, tambah 80 ml asam fosfat 85%, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk.

Fase gerak. Pada 80 ml asetonitril dan 10 ml dapar, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, aduk dan saring. Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutkan dan encerkan 25 mg standar biotin dengan air sampai batas volume 250 ml dan aduk. Pada 1,5 ml larutan, encerkan dengan air sampai konsentrasi 0,6 µg/ml biotin. [Gunakan sebagian larutan standar untuk penentuan angka temuan kembali pada prosedur ekstraksi fasa-padat (*solid phase extraction*)].

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan setara dengan 60 µg biotin dengan air (jika perlu sonikasi selama 30–40 menit) sampai batas volume 100 ml dan saring. Atur pH 6,0–7,0 dengan asam asetat atau natrium hidroksida 0,1 M.

Ekstraksi fasa-padat (*solid-phase extraction*). [Sebelum digunakan, bilas kolom dengan 2 ml metanol. Ekuilibrasikan dengan 2 ml air]: pipet masing-masing 5 ml larutan uji dan larutan standar ke dalam kolom ekstraksi fasa-padat yang berbeda (mengandung penukar ion dan fase terbalik kopolimer N-vinilpirolidon dan divinilbenzen). Bilas kolom dengan 10 ml metanol (30% v/v). Alirkan sekitar 4,9 ml pada metanol (30% v/v dalam asam hidroklorida 0,1 M) ke dalam kolom. Campur eluat ke dalam labu ukur-5 ml, yang mengandung 100 µl natrium asetat (40% v/v) dan encerkan

dengan metanol (30% v/v dalam asam hidroklorida 0,1 M) sampai volume 5,0 ml.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 atau yang sesuai.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 200 nm.

Kesesuaian sistem. Faktor tailing tidak lebih dari 1,5; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 2%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi biotin dalam larutan standar (µg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{std} = area puncak larutan standar

Vitamin B₁₂ (sianokobalamin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campuran air dan metanol (65:35). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutkan standar sianokobalamin dalam air sampai konsentrasi 10 µg/ml. Encerkan stok larutan dengan air sampai konsentrasi 1 µg/ml.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan setara 100 µg sianokobalamin dengan air sampai batas volume 250 ml. Saring dan gunakan hasil saringan.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 15 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir 0,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm.

Kesesuaian sistem. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 200 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi sianokobalamin dalam larutan standar (µg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode mikrobiologi, menggunakan:

Larutan stok standar sianokobalamin. Larutkan

standar sianokobalamin dalam alkohol 25% sampai konsentrasi 1 µg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar sianokobalamin dengan air sampai konsentrasi 0,01 dan 0,04 ng/ml. Larutan harus segar.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 1,0 µg sianokobalamin, tambah 25 ml larutan pengekstrak (yang mengandung 1,29 g natrium fosfat dibasa, 1,1 g asam sitrat anhidrat dan 1 g natrium metabisulfid dalam 100 ml), sterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit. Saring atau sentrifus jika diperlukan. Encerkan hasil saringan atau supernatan dengan air sampai konsentrasi antara 0,01 dan 0,04 mg/ml.

Larutan asam kasein-hidrolisat. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 2.

Larutan asparagin. Larutkan dan encerkan 2,0 g L-asparagin dalam air sampai batas volume 200 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan adenin-guanin-urasil. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 2.

Larutan xantin. Larutkan 0,2 g xantin dalam sekitar 30 ml air, panaskan pada suhu 70°C, tambah 6 ml amonium hidroksida 6M dan aduk sampai larut. Dinginkan dan tambah air sampai batas volume 200 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan garam 1. Larutkan dan encerkan 10 g kalium fosfat monobasa dan 10 g kalium fosfat dibasa dalam air sampai batas volume 200 ml dan tambah 2 tetes asam hidroklorida. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan garam 2. Larutkan 4 g magnesium sulfat, 0,2 g natrium klorida, 0,2 g besi sulfat dan 0,2 g mangan sulfat dalam air sampai batas volume 200 ml dan tambah 2 tetes asam hidroklorida. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan polisorbit 80. Larutkan dan encerkan 20 g polisorbit 80 dalam alkohol sampai batas volume 200 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan vitamin 1. Larutkan dan encerkan 10 mg riboflavin, 10 mg tiamin hidroklorida, 100 µg biotin dan 20 mg niasin dalam asam asetat glasial 0,02 M sampai volume 400 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan vitamin 2. Larutkan dan encerkan 20 mg asam p-aminobenzoat, 10 mg kalsium pantotenat, 40 mg piridoksin hidroklorida, 40 mg piridoksal hidroklorida, 8 mg piridoksamin dihidroklorida dan 2 mg asam folat dalam campuran air dan alkohol netral (3:1) sampai volume 400 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan basal stok medium. Larutkan bahan-bahan di bawah ini dalam asam hidroklorida

secukupnya sampai larut. Tambah 100 ml air, aduk dan larutkan dekstrosa, natrium asetat dan asam askorbat. Saring, jika diperlukan, tambah larutan polisorbitat 80. Atur pH 5,5–6,0 dengan natrium hidroksida 1 M dan tambah air murni sampai batas volume 250 ml.

Komposisi medium. Campur 0,1 g L-sistin, 0,05 g L-triptofan, 10 ml asam hidroklorida 1 M, 5 ml larutan adenine-guanin-urasil, 5 ml larutan xantin, 10 ml larutan vitamin 1, 10 ml larutan vitamin 2, 5 ml larutan garam (1), 5 ml larutan garam (2), 5 ml larutan asparagin, 25 ml larutan asam kasein-hidrolisat, 10 g dekstrosa anhidrat, 5 g natrium asetat anhidrat, 1 g asam askorbat dan 5 ml larutan polisorbitat 80.

Jus tomat. Sentrifus jus tomat yang dijual secara komersial sampai kotoran hilang. Saring sampai diperoleh sampai diperoleh hasil saringan berwarna kekuning-kuningan. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Medium kultur. Larutkan 0,75 g sari ragi, 0,75 g pepton, 1 g dekstrosa anhidrat dan 0,2 g kalium fosfat monobasa dalam sekitar 60 ml air. Tambah 10 ml jus tomat dan 1 ml larutan polisorbitat 80. Atur pH 6,8 dengan natrium hidroksida 1 M dan tambah air sampai batas volume 100 ml. Pindahkan 10 ml larutan dalam tabung uji dan sumbat dengan katun. Sterilkan pada otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan dengan cepat untuk menghindari perubuhan warna yang dihasilkan dari medium yang terlalu panas.

Suspensi medium. Encerkan larutan basal stok medium dengan air dengan volume yang sama. Pindahkan 10 ml medium ke dalam tabung uji. Sterilkan pada otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan dengan cepat untuk menghindari perubahan warna yang dihasilkan dari medium yang terlalu panas.

Stokkultur *Lactobacillus leichmannii*. Inokulasikan *Lactobacillus leichmannii* ke dalam 10 ml medium kultur yang steril (mengandung 1–1,5 g agar/100 ml). Inkubasi pada suhu 30°–40°C selama 16–24 jam. Simpan dalam lemari pendingin. Gunakan stok kultur yang segar untuk penetapan kadar.

Inokulum. [Suspensi beku *Lactobacillus leichmannii* atau *Lactobacillus plantarum* dapat digunakan sebagai stok kultur untuk menghasilkan inokulum yang sebanding dengan kultur segar]. Pindahkan secukupnya dari stok kultur *Lactobacillus leichmannii* ke dalam tabung steril yang mengandung 10 ml medium kultur. Inkubasi pada suhu 300°–400°C selama 16–24 jam. Suspensikan biakan dalam 5 ml suspensi medium steril dan campur. Atur volume dengan garam fisiologis sehingga campuran 1 berbanding 20 mempunyai nilai %T = 70% pada panjang gelombang 530 nm, larutan garam fisiologis sebagai blanko. Encerkan larutan sampai 1 berbanding 400 menggunakan larutan stok basal medium.

Prosedur. Pada tabung terpisah, tambah masing-

masing 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; dan 5,0 ml larutan standar. Pada setiap tabung tersebut dan empat tabung lain, tambah 5,0 ml larutan stok basal medium dan air sampai volume 10 ml. Pada tabung yang terpisah, tambah 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 dan 4,0 ml larutan uji. Pada setiap tabung tersebut dan empat tabung lain, tambah 5,0 ml larutan stok basal medium dan air sampai volume 10 ml. Sterilkan tabung pada otoklaf pada suhu 121°C selama 5 menit. Tambah 0,5 ml inokulum pada setiap tabung yang telah disiapkan, kecuali dua tabung untuk blanko. Inkubasi pada suhu 300°–400°C selama 16–24 jam. Panaskan tabung pada suhu 80°C selama 5 menit. Dinginkan pada suhu ruang.

Ukur %T dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm selama 30 detik.

Perhitungan. Lakukan perhitungan dengan bantuan kurva konsentrasi-respon (%T) atau dengan bantuan program yang tersedia pada peralatan.

Asam folat

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pereaksi (1). Larutan tetrabutylamonium hidroksida 25% dalam metanol.

Pereaksi (2). Larutkan dan encerkan 5 g asam pentetat dalam natrium hidroksida 1 M sampai batas volume 50 ml.

Fase gerak. Larutkan 2 g kalium fosfat monobasa dalam 650 ml air. Tambah 12 ml pereaksi (1), 7 ml asam fosfat 3 M dan 240 ml metanol. Dinginkan pada suhu ruang, atur pH 7,15 dengan asam fosfat dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, aduk dan saring. [Periksa kembali pH sebelum digunakan, jika diperlukan buat penyesuaian kandungan metanol dan air (1%–3%) pada fase gerak untuk memperoleh pemisahan dan garis dasar asam folat dan standar internal yang baik].

Larutan standar internal. Pada 40 mg metilparaben tambah 220 ml metanol aduk sampai larut. Larutkan 2 g kalium fosfat monobasa dalam 300 ml air. Campurkan kedalam larutan yang bersi metil paraben, tambah 300 ml air dan aduk. Tambah 19 ml pereaksi (1), 7 ml asam fosfat 3 M dan 30 ml pereaksi (2). Atur pH 9,8 dengan amonia. Alirkan nitrogen kedalam larutan selama 30 menit, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar asam folat dalam larutan standar internal sampai konsentrasi 0,2 mg/ml. Encerkan 2 ml dengan larutan standar internal sampai volume 25 ml dan aduk.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan setara dengan 0,4 mg asam folat dalam 25 ml larutan standar internal, aduk selama 10 menit,

dan sentrifus. Saring supernatan dan gunakan hasil saringan untuk penetapan.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 30 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1 ml/menit

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

Injek larutan standar, waktu tambat relatif sekitar 0,8 untuk asam folat dan 1,0 untuk metilparaben; simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 15 µl larutan standar, larutan standar internal dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$25 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi asam folat larutan standar, (mg/ml)

A_s dan A_{Std} = perbandingan area asam folat terhadap metilparaben pada larutan uji dan larutan standar

- Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pereaksi. Larutkan 7,5 g dinatrium edetat dalam 500 ml air (yang mengandung 10 ml amonium hidroksida).

Pelarut pengencer. Amonium hidroksida (60 µg/ml).

Fase gerak. Encerkan 0,4 ml trietilamin, 15 ml asam asetat glasial dan 350 ml metanol dengan natrium 1-heksansulfonat 0,008 M sampai batas volume 2000 ml dan saring. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar asam folat ke dalam pelarut pengencer sampai konsentrasi 60 µg/ml. Larutan harus segar.

Larutan standar. Pada 5 ml larutan stok standar, tambah 10 ml metanol dan 35 ml pereaksi. Aduk selama 15 menit di dalam penangas air pada suhu 60°C, dinginkan. Saring (buang beberapa ml hasil saringan pertama) dan gunakan hasil saringan.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 0,3 mg asam folat, tambah 10 ml metanol dan 35 ml pereaksi. Aduk selama 15 menit didalam penangas air pada suhu 60°C, dinginkan. Saring (buang beberapa ml hasil saringan pertama), gunakan hasil saringan.

Kolom. Oktilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm, suhu 59°C.

Kecepatan alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 270 nm.

Injek larutan standar, Simpangan baku tidak lebih dari 2,0%.

Injek 5 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$45 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi asam folat dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Kalsium pantotenat

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

- Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campur air dan asam fosfat (1000:1). Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar internal. Larutkan 80 mg asam p-hidroksibenzoat dalam 3 ml alkohol. Tambah 50 ml air dan 7,1 g natrium fosfat dibasa. Encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk. Atur pH 6,7, dengan asam fosfat.

Larutan standar. Larutkan standar kalsium pantotenat dengan larutan standar internal sampai konsentrasi 0,6 mg/ml.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 15 mg kalsium pantotenat, tambah 25 ml larutan standar internal, aduk selama 10 menit dan saring. Gunakan hasil saringan.

Kolom. Oktadesilsilil, 25 cm x 3,9 mm.

Laju alir. 1,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 210 nm.

Injek larutan standar, waktu tambat relatif adalah 0,5 untuk kalsium pantotenat dan 1,0 untuk asam p-hidroksibenzoat; simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek larutan standar, Simpangan baku tidak lebih dari 2,0%.

Injek 10 µl larutan standar, larutan standar internal dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$25 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi kalsium pantotenat dalam larutan standar (mg/ml)

A_s dan A_{Std} = perbandingan area kalsium pantotenat terhadap parahidroksibenzoat pada larutan uji dan larutan standar

- Lakukan dengan metode mikrobiologi, menggunakan:

Larutan stok standar. Larutkan 50 mg kalsium pantotenat (sebelumnya dikeringkan dan disipkan

dalam tempat gelap diatas fosfor pentoksida) dalam 500 ml air. Tambah 10 ml asam asetat 0,2 M, 100 ml larutan natrium asetat (1 dalam 60), dan encerkan dengan air sampai konsentrasi 50 µg/ml. Simpan botol dalam toluen di lemari pendingin.

Larutan standar. Eencerkan larutan stok standar dengan air sampai konsentrasi 0,01—0,04 µg/ml kalsium pantotenat.

Larutan uji. Larutkan sediaan setara 50 mg kalsium pantotenat dalam 500 ml air. Tambah 10 ml asam asetat 0,2 M, 100 ml larutan natrium asetat (1 dalam 60), encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan saring. Encerkan larutan sampai konsentrasi setara dengan larutan standar.

Larutan asam-kasein hidrolisat. Campurkan 100 g vitamin bebas kasein dengan 500 ml asam hidroklorida 6M dan refluks selama 8—12 jam. Suling dengan pengurangan tekanan (untuk menghilangkan asam hidroklorida) sampai terbentuk pasta. Larutkan pasta dalam air, atur pH $3,5 \pm 0,1$ dengan natrium hidroksida 1 M dan tambah air sampai batas volume 1000 ml. Tambah 20 g arang aktif, aduk selama 1 jam dan saring ke dalam botol. Ulangi proses dengan arang aktif. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

Larutan sistin-triptofan. Suspensikan 4,0 g L-sistin dalam 1,0 g L-triptofan (atau 2,0 g D,L-triptofan) dalam sekitar 700 ml air, panaskan pada suhu 70°—80°C, tambah setetes demi setetes larutan asam hidroklorida (1 dari 2), dan aduk. Dinginkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

Larutan urasil-guanin-adenin. Larutkan 200 mg adenin sulfat, guanin hidroklorida, dan urasil dalam 10 ml asam hidroklorida 4M sambil dipanaskan, dinginkan, dan tambah air sampai batas volume 200 ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan polisorbate 80. Larutkan dan encerkan 25 g polisorbate 80 dalam alkohol sampai batas volume 250 ml.

Larutan riboflavin-tiamin hidroklorida-biotin. Larutan riboflavin dan tiamin hidroklorida dan biotin dalam asam asetat 0,02 M yang mengandung 20 µg/ml riboflavin dan 10 µg/ml tiamin hidroklorida dan 0,04 µg/ml biotin. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih 10°C.

Larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida. Campuran air dan alkohol netral (3:1) yang mengandung 10 µg/ml asam p-aminobenzoat, 50 µg/ml niasin dan 40 µg/ml piridoksin hidroklorida. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan garam 1. Larutkan dan encerkan 25 g kalium fosfat monobasa dan 25 g kalium fosfat dibasa dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

Larutan garam 2. Larutkan dan encerkan 10 g magnesium sulfat, 0,5 g natrium klorida, 0,5 g besi sulfat dan 0,5 g mangan sulfat dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

Stok kultur *Lactobacillus plantarum*. Larutkan 2 g sari ragi dalam 100 ml air, tambah 500 mg dekstrosa anhidrat, 500 mg natrium asetat anhidrat dan 1,5 g agar. Panaskan campuran di atas penangas air dengan pengadukan sampai agar larut. Pindahkan 10 ml larutan panas pada tabung uji, sumbat, sterilkan pada otoklaf 121°C selama 15 menit dan biarkan tabung sampai dingin dalam posisi tegak lurus. Siapkan stok kultur pada tiga atau lebih tabung, gunakan kultur murni *Lactobacillus plantarum*, inkubasi selama 16—24 jam pada suhu 30°—37°C. Simpan dalam lemari pendingin. Siapkan stok kultur segar setiap minggunya dan jangan gunakan untuk inokulum jika kultur lebih dari 1 minggu.

Medium kultur. Setiap tabung uji mengandung 5 ml larutan basal stok medium, tambah 5 ml air yang mengandung 0,5 mg kalsium pantotenat. Sumbat dengan katun, sterilkan pada otoklaf 121°C selama 15 menit dan dinginkan.

Inokulum. [Suspensi beku *Lactobacillus plantarum* dapat digunakan sebagai stok kultur untuk menghasilkan inokulum yang sebanding dengan kultur segar]. Pindahkan secukupnya dari stok kultur *Lactobacillus plantarum* ke dalam tabung steril yang mengandung 10 ml medium kultur. Inkubasi pada suhu 30°—37°C selama 16—24 jam.

Larutan stok basal medium. Campur 25 ml larutan asam-kasein hidrolisat, 25 ml larutan sistin-triptofan, 0,25 ml larutan polisorbate 80, 10 g dekstrosa anhidrat, 5 g natrium asetat anhidrat, 5 ml larutan urasil-guanin-adenin, 5 ml larutan kalsium pantotenat, 5 ml larutan riboflavin-tiamin hidroklorida, 5 ml larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida, 5 ml larutan garam (1), 5 ml larutan garam (2), atur pH $6,8 \pm 0,1$ dengan natrium hidroksida 1 M dan encerkan dengan air sampai batas volume 250 ml.

Prosedur. Siapkan enam tabung, tambah ke setiap tabung yang berbeda 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ml larutan standar. Pada setiap tabung dan empat tabung kosong lain, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml.

Pada empat tabung yang kosong, tambahkan larutan uji 2—3 kali larutan standar termasuk 2,0; 3,0; dan 4,0 ml. Pada setiap tabung, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml.

Sumbat semua tabung, sterilkan pada otoklaf 121°C selama 15 menit. Dinginkan, tambah 1 tetes inokulum pada setiap tabung, kecuali dua dari empat tabung tidak mengandung larutan standar (blanko) dan aduk. Inkubasi pada suhu 30°—37°C selama 16—24 jam inkubasi. Dalam 2 jam pertama tidak terjadi kekeruhan dalam tabung yang mengandung standar dengan konsentrasi paling tinggi.

Ukur %T dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540—660 nm.

Perhitungan. Lakukan perhitungan dengan bantuan kurva konsentrasi-respon (%T) atau dengan bantuan program yang tersedia pada peralatan.

- Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Dapar fosfat. Larutkan dan encerkan 10 g kalium fosfat monobasa dalam air sampai batas volume 2000 ml. Atur pH 3,5 dengan sam fosfat.

Fase gerak. Campur dapar fosfat dan metanol (90:10). Jika perlu, lakukan penyesuaian jika diperlukan (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutan standar kalsium pantotenat dalam air sampai konsentrasi 0,25 mg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar dengan air sampai konsentrasi 40 µg/ml.

Larutan uji. Larutkan sediaan setara 10 mg kalsium pantotenat dengan 50 ml metanol, dan encerkan dengan air sampai batas volume 250 ml dan saring.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 3,9 mm, atau yang sesuai, suhu 50°C.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 205 nm.

Injek larutan standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3,0%.

Injek 25 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$250 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi kalsium pantotenat dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Niasin atau niasinamid, piridoksin hidroklorida, riboflavin dan tiamin hidroklorida

Vitamin B₃ (niasin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

- Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Larutan pengencer. Campur air, asetonitril, dan asam asetat glasial (94:5:1).

Fase gerak. Campur air, metanol, dan asam asetat glasial (73:27:1) yang mengandung 140 mg natrium 1-heksansulfonat per 100 ml. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Pada 80 mg standar niasinamid, 20 mg standar piridoksin hidroklorida, 20 mg

standar riboflavin, dan 20 mg standar tiamin hidroklorida, tambah 180 ml larutan pengencer. Rendam labu dalam penangas air pada suhu 65°—70°C selama 10 menit sambil diaduk sampai larut. Dinginkan segera dalam air dingin selama 10 menit pada suhu ruang, encerkan dengan larutan pengencer sampai batas volume 200 ml dan aduk.

Larutan uji. Pada sediaan setara 10 mg niasinamid dan 2,5 mg setiap piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida, tambah 25 ml larutan pengencer, dan aduk selama 30 detik sampai larut. Rendam tabung sentrifus dalam penangas air pada suhu 65°—70°C, panaskan selama 5 menit, dan aduk selama 30 detik. Masukkan kembali tabung ke dalam penangas air, panaskan kembali selama 5 menit, dan aduk selama 30 detik. Saring larutan, dinginkan pada suhu ruang, dan gunakan saringan. [Catatan - gunakan saringan dalam jangka waktu 3 jam].

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 3,9 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

Injek larutan standar, waktu tambat relatif dari niasinamid, piridoksin, riboflavin, dan tiamin adalah sekitar 0,3; 0,5; 0,8; dan 1,0; simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 25 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$25 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi niasin dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

- Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Larutan pengeksrak. Pada 1 ml asam asetat glasial dan 2,5 g dinatrium edetat larutkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk. Campur larutan dengan metanol (75:25).

Fase gerak. Natrium asetat 0,1M (larutkan 13,6 g natrium asetat ke dalam 1000 ml air. Atur pH 5,4 dengan asam asetat dan aduk. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi), tambah metanol sampai konsentrasi 1%.

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar niasin dalam larutan pengeksrak sampai konsentrasi 1 mg/ml.

Larutan standar. Encerkan 5 ml larutan stok standar dengan larutan pengeksrak sampai volume 25 ml.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 2 mg riboflavin atau setara dengan 2 mg piridoksin atau setara

dengan 20 mg niasin atau niasinamid, tambah 100 ml larutan pengestrak dan aduk selama 20 menit dalam penangas air pada suhu 70°–75°C, dan panaskan selama 20 menit. Aduk selama 30 detik, dinginkan pada suhu ruang dan saring. Gunakan hasil saringan.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1 ml/menit

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%. Bilas kolom dengan metanol.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi niasin dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

- Lakukan dengan metode kromatografi cair (untuk niasin atau niasinamida, piridoksin hidroklorida, riboflavin dan tiamin).

Pereaksi. Larutan 25 g dinatrium edetat dalam 1000 ml air.

Fase gerak. Pada 0,4 ml trietilamin, 15,0 ml asam asetat glasial dan 350 ml metanol, tambah natrium 1-heksansulfonat 0,008M sampai batas volume 2000 ml dan aduk. Saring dan gunakan hasil saringan. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan standar niasin atau niasinamid, piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida dengan pereaksi (jika perlu, panaskan), sampai konsentrasi 1,5 mg/ml (niasin atau niasinamid), 0,24 mg/ml (piridoksin hidroklorida), 0,08 mg/ml (riboflavin) dan 0,24 mg/ml (tiamin hidroklorida).

Larutan standar. Pada 5 ml larutan stok standar, tambah 10 ml campuran metanol dan asam asetat glasial (9 : 1) dan 30 ml campuran metanol dan etilen glikol (1 : 1). Sumbat, aduk selama 15 menit dalam penangas air pada suhu 60°C, dan dinginkan. Saring dan buang beberapa ml hasil saringan pertama.

Larutan uji. Pada sediaan setara 7,5 mg niasin atau niasinamid, 1,2 mg piridoksin hidroklorida, 0,4 mg riboflavin, dan 1,2 mg tiamin hidroklorida. Tambah 10 ml campuran metanol dan asam asetat glasial (9 : 1), 30 ml campuran metanol dan etilen glikol (1 : 1). Sumbat dan aduk selama 15 menit dalam penangas air pada suhu 60°C, dan dinginkan. Saring dan buang beberapa ml hasil saringan pertama.

Kolom. Oktilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai. Suhu 50°C.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 270 nm.

Injek standar; simpangan baku relatif tidak lebih dari 2%.

Injek 5 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$40 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi niasin dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Vitamin B₃ (niasinamid)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

- Lihat metode 1 untuk niasin.
- Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan: Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar niasin, metode 2, menggunakan: larutan pengestrak, fase gerak, larutan stok standar, larutan standar, larutan uji, dan sistem kromatografik.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi niasinamid dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

- Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B₆ (piridoksin hidroklorida)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

- Lihat metode 1 untuk niasin.
- Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan : Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar niasin, metode 2, menggunakan: larutan pengestrak, fase gerak.

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar piridoksin hidroklorida dalam larutan pengestrak sampai konsentrasi 0,1 mg/ml.

Larutan standar. Encerkan 5 ml larutan stok standar dengan larutan pengestrak sampai volume 25 ml dan aduk.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin, metode 2.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm.

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi piridoksin hidroklorida dalam larutan standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B₂ (riboflavin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan :

Larutan pengekstrak. Lihat metode 2 untuk niasin.

Fase gerak. Larutkan 6,8 g natrium asetat dalam 1000 ml air dan aduk. Campur larutan dengan metanol (65:35). Tambah 2 ml trietilamin, atur pH 5,2 dengan asam asetat glasial. Jika perlu, lakukan penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Pada 20 mg standar riboflavin, tambah 180 ml larutan pengekstrak dan panaskan selama 5 menit dalam penangas air pada suhu 65°—75°C dan aduk. (Jika diperlukan ulangi proses tersebut sampai larut). Dinginkan dalam air dingin pada suhu ruang, encerkan dengan larutan pengekstrak sampai batas volume 2000 ml dan aduk.

Larutan standar. Encerkan 5 ml larutan stok standar dengan larutan pengekstrak sampai volume 25 ml dan aduk.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin, metode 2.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek larutan standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi riboflavin dalam larutan standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B₁ (tiamin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Larutkan 1,88 g natrium 1-heksansulfonat dalam 1000 ml asam fosfat (0,1%). Campur larutan dengan asetonitril (92:18). Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar tiamin hidroklorida dalam asam hidroklorida 0,2 M sampai konsentrasi 0,1 mg/ml.

Larutan standar. Encerkan 5 ml larutan stok standar dengan asam hidroklorida 0,2 M sampai volume 25 ml.

Larutan uji. Larutkan sediaan setara dengan 2 mg tiamin dalam 100 ml asam hidroklorida 0,2 M, aduk selama 15 menit dan didihkan selama 30 menit. Dinginkan pada suhu ruang, dan saring. Gunakan saringan.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi tiamin dalam larutan standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium dan seng

Lakukan dengan metode seperti yang tertera pada vitamin larut lemak, air dan mineral tablet.

Penyimpanan

Disimpan dalam wadah, tertutup rapat dan terlindung dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi, 2) Jenis sediaan, 3) Indikasi, 4) Waktu kadaluwarsa, 5) Kondisi penyimpanan.

Vitamin Larut Air, Lemak dan Mineral Tablet

Definisi

Vitamin larut air, lemak dan mineral dalam sediaan tablet mengandung dua atau lebih vitamin larut lemak yaitu: Vitamin A, vitamin D sebagai ergokalsiferol (vitamin D₂) atau kolekalsiferol (vitamin D₃), vitamin E, fitonadion (vitamin K₁), β-karotin; dan satu atau lebih vitamin yang dapat larut dalam air yaitu: asam askorbat atau setara dengan kalsium askorbat atau natrium askorbat, biotin, sianokobalamin, asam folat, niasin atau niasinamid, asam pantotenik (sebagai kalsium pantotenat atau rasemik kalsium pantotenat), piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; dan satu atau lebih mineral dilengkapi dengan satu atau lebih unsur-unsur berikut dalam ionisasi: kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium, dan seng serta dapat mengandung zat lain yang tertera dalam etiket dengan jumlah yang akurat.

Tablet memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan tablet dan persyaratan berikut:

Mengandung tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera pada etiket untuk vitamin A (C₂₀H₃₀O) sebagai retinol atau ester retinol dalam bentuk retinil asetat (C₂₂H₃₂O₂) atau retinil palmitat (C₃₆H₆₀O₂), vitamin D sebagai kolekalsiferol (C₂₇H₄₄O) atau ergokalsiferol (C₂₈H₄₄O), vitamin E sebagai α-tokoferol (C₂₉H₅₀O₂) atau α-tokoferil asetat (C₃₁H₅₂O₃) atau α-tokoferil suksinat (C₃₃H₅₄O₅), fitonadion (C₃₁H₄₆O₂), dan β-karotin (C₄₀H₅₆) tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera dalam etiket untuk asam askorbat (C₆H₈O₆) atau garamnya sebagai kalsium askorbat (C₁₂H₁₄CaO₁₂·2H₂O) atau natrium askorbat (C₆H₇NaO₆), biotin (ClOH₁₆N₂O₃S), sianokobalamin (C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P), asam folat (C₁₉H₁₉N₇O₆), niasin (C₆H₅NO₂), atau niasinamid (C₆H₆N₂O), kalsium pantotenat (C₁₈H₃₂CaN₂O₁₀), piridoksin hidroklorida (C₈H₁₁NO₃·HCl), riboflavin (C₁₇H₂₀N₄O₆), dan tiamin (C₁₂H₁₇CIN₄OS) sebagai tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; kalsium (Ca), tembaga (Cu), besi (Fe), magnesium (Mg), mangan (Mn), fosfor (P), kalium (K), dan seng (Zn); kromium (Cr), fluorin (F), iodium (I), molibdenum (Mo), dan selenium (Se).

Identifikasi

Lakukan dengan cara seperti yang tertera pada penetapan kadar.

Waktu hancur dan disolusi. Memenuhi persyaratan untuk uji waktu hancur.

Keseragaman bobot. Memenuhi persyaratan uji keseragaman.

Penetapan kadar

Vitamin A (retinol)

Lakukan dengan salah satu metode dibawah beriku:

1. Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan:

Asam sulfat – metanol 3 M. Tambah dengan hati-hati 9 ml asam sulfat ke dalam 80 ml metanol dalam labu -100 ml. Dinginkan, dan encerkan dengan metanol sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Natrium askorbat-pirogallol. Pada 10 g natrium askorbat dan 5 g pirogallol, tambah air sampai larut. Tambah 1,7 ml asam sulfat, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml.

Lesitin. Larutkan dan encerkan 0,5 g lesitin dengan 2,2,4-trimetilpentan sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Fase gerak. Campuran n-heksan dan etil asetat (99,7 : 0,3).

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar vitamin A (retinil asetat) dalam 2,2,4-trimetilpentan sampai konsentrasi 15 µg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan sediaan retinil palmitat dalam 2,2,4-trimetilpentan sampai konsentrasi 15 µg/ml. Campur larutan dengan larutan standar sampai masing-masing konsentrasi 7,5 µg retinil asetat/ml dan 7,5 µg retinil palmitat/ml.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 30 µg kolekalkiferol atau ergokalkiferol atau setara dengan 90 mg vitamin E (sebagai α-tokoferol, α-tokoferil asetat, atau α-tokoferil hemisuksinat) atau setara dengan 2,5 mg retinil asetat atau retinil palmitat. Tambah 0,5 g natrium bikarbonat, 1,5 ml lesitin, dan 12,5 ml 2,2,4-trimetilpentan, aduk.. Tambah 6 ml larutan natrium askorbat-pirogallol, aduk, dan biarkan larutan sampai gas keluar. Lanjutkan pengadukan sampai evolusi gas telah berhenti, aduk kembali selama 12 menit. Tambahkan 6 ml dimetilsulfoksid, aduk sampai terbentuk suspensi, dan aduk selama 12 menit. Tambahkan 6 ml larutan asam sulfat-metanol 3 M, campur sampai terbentuk suspensi, dan aduk selama 12 menit. Tambahkan 12,5 ml 2,2,4-trimetilpentan, aduk sampai terbentuk suspensi, dan kocok selama 10 menit. Sentrifus selama 10 menit untuk memecahkan emulsi dan supernatan menjadi jernih. [supernatan untuk penetapan kadar vitamin A, D dan E]. Jika diperlukan, larutkan supernatan dengan 2,2,4-trimetilpentan sampai diperoleh konsentrasi setara dengan larutan standar.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 325-nm.

Kolom. Polimer vinil, 5 µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

Laju alir. 1,5 m per menit.

Kesesuaian sistem. Resolusi, antara retinil asetat dan retinil palmitat tidak kurang dari 8,0; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 40 µL larutan standar dan larutan uji dan ukur area puncak untuk retinil asetat yang diperoleh dari larutan standar dan area puncak untuk retinil asetat atau retinil palmitat yang diperoleh dari larutan uji. Hitung kadar (mg) dari vitamin A, sebagai retinol dengan rumus :

$$26,5 \text{ ECD} \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

E = faktor konversi untuk retinil asetat dari vitamin A

0,872 = faktor

C = konsentrasi vitamin A standar (mg/ml)

D = faktor pelarut (ml), digunakan untuk persiapan larutan uji dari supernatan

A_S = area puncak all-trans retinil ester diperoleh dari larutan uji

A_{Std} = area puncak all-trans retinil ester diperoleh dari standar

2. Lakukan dengan kromatografi cair menggunakan:

Larutan pengekstrak. Campur n-heksan dan metilen klorida (3:1).

Kalium hidroksida. Larutkan 80 g kalium hidroksida dalam 100 ml air, aduk, dan dinginkan.

Larutan pengencer. Larutkan 1 g pirogallol dalam alkohol sampai batas volume volume 100,0 ml dan aduk.

Fase gerak. Campuran n-heksan dan isopropil-alkohol (92 : 8). Jika diperlukan lakukan penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan sediaan vitamin A dalam larutan pengencer sampai konsentrasi 30 µg/ml. Larutan disimpan dalam lemari pendingin selama 1 minggu.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar dengan larutan pengencer sampai konsentrasi 1 µg/ml vitamin A. Pada 10 ml larutan, tambah 5 ml air, 5 ml larutan pengencer dan 3 ml larutan kalium hidroksida. Aduk selama 15 menit di atas penangas air dengan suhu 60° ± 5°C, dan dinginkan dalam suhu ruang. Tambah 7 ml air dan 25 ml larutan pengekstrak. Aduk selama 60 detik. Bilas labu dengan 60 ml air, biarkan selama 10 menit sampai lapisan terpisah. Larutan standar mengandung 0,34 µg/ml retinol.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 1,5 mg retinil asetat, tambah 5 ml air, 15 ml larutan pengencer dan 3 ml larutan kalium hidroksida. Aduk selama 15 menit di atas penangas air dengan suhu 60° ± 5°C dan dinginkan pada suhu ruang. Tambah 7 ml air dan 25 ml larutan pengekstrak. Aduk selama 60 detik atau lebih. Bilas labu dengan 60 ml air, dan biarkan selama 10 menit sampai lapisan terpisah. [Jangan dikocok, saat emulsi terbentuk]. Encerkan sebagian lapisan organik dengan larutan pengekstrak sampai konsentrasi 0,34 µg/ml (retinol).

Kolom. Silika gel, 5 µm, ukuran 8,0 cm x 6,2 mm, atau yang sesuai dengan suhu 40°C.

Laju alir. 4 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 335 nm

Injek 50 µl larutan standar dan larutan uji ke dalam kromatograf. Hitung kadar (mg), dari vitamin A, sebagai retinol dengan rumus:

$$0,872 \text{ CD} \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

0,872 = faktor konversi untuk retinil asetat, dari standar vitamin A

C = konsentrasi vitamin A standar (mg/ml)

D = faktor pelarut (ml) digunakan untuk larutan uji

A_S = jumlah area puncak all-trans retinol dan 13-cis retinol yang dari larutan uji

A_{Std} = area puncak all-trans retinil asetat yang diperoleh dari larutan standar

Vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campuran n-heksan dan isopropil-alkohol (99 : 1). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutkan standar kolekalsiferol atau ergokalsiferol dalam n-heksan sampai konsentrasi 2 µg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Panaskan larutan standar dengan suhu 60° selama 1 jam untuk mendapatkan isomer vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol) sebagai prekursor.

Larutan uji. Uapkan 20 ml larutan, yang diperoleh pada penetapan kadar vitamin A (metode 1) sampai konsentrasi 2 µg/ml (kolekalsiferol atau ergokalsiferol).

Kolom. Aminopropilsilil 10 µm, ukuran 15 cm x 4,6 mm.

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 265 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara vitamin D yang terbentuk dan prekursor tidak kurang dari 10; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dari kolekalsiferol atau ergokalsiferol dengan rumus:

$$1,09 \text{ CD} \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

1,09 = faktor-koreksi untuk menghitung jumlah previtamin D yang ada dalam sediaan

C = konsentrasi kolekalsiferol dan ergokalsiferol pada larutan standar (µg/ml)

D = faktor pelarut (ml) untuk larutan uji

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan :

Asam sulfat–metanol 3 M. Tambah dengan hati-hati 9 ml asam sulfat dalam 80 ml metanol. Dinginkan, dan encerkan dengan metanol sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Natrium askorbat-pirogallol. Pada 10 g natrium askorbat dan 5 g pirogallol, tambah air sampai larut. Tambah 1,7 ml asam sulfat, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml.

Lesitin. Larutkan dan encerkan 0,5 g lesitin dengan 2,2,4-trimetilpentan sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Fase gerak. Campur n-heksan dan butanol (98,75 : 1,25). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem (kromatografi)).

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar kolekalsiferol atau standar ergokalsiferol dalam 2,2,4-trimetilpentan sampai konsentrasi 1 µg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Panaskan larutan standar pada suhu 60° selama 1 jam untuk mendapatkan isomer vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol) sebagai prekursor.

Kolom. Polimer vinil gel, 5-µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

Laju alir. 1 ml/menit.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara vitamin D yang terbentuk dan prekursor tidak kurang dari 10; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dari kolekalsiferol atau ergokalsiferol dengan rumus:

$$26,5 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi kolekalsiferol atau ergokalsiferol larutan standar (µg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

3. Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan :

Asam asetat encer. Encerkan 10 ml asam asetat glasial dengan air sampai batas volume 100,0 ml.

Larutan fenolftalein. Fenolftalein (1 g per 100 ml alkohol).

Larutan kalium hidroksida-alkohol. Larutkan 14 g kalium hidroksida dalam campuran 31 ml alkohol anhidrat dan 5 ml air. Larutan harus segar.

Larutan pengekstrak. Campuran metilen klorida dan isopropil alkohol (99,8:0,2).

Fase gerak. Campur asetonitril dan metanol (91:9). Jika diperlukan, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan kolekalsiferol atau ergokalsiferol dalam alkohol anhidrat sampai konsentrasi 0,2 mg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan standar. [Kondisikan kolom ekstraksi fasa-padat dengan cara bilas kolom dengan 4 ml campuran metilen klorida dan isopropil alkohol (80:20), kemudian dengan 5 ml larutan pengekstrak. Jangan biarkan kolom kering]. Encerkan larutan stok standar dengan alkohol anhidrat sampai konsentrasi 5 µg/ml. Pada 2 ml larutan, tambah 15 ml air dan 15 ml larutan kalium hidroksida-alkohol, sumbat, aduk selama 30 menit dalam penangas air 60°C. Dinginkan pada suhu ruang dan pindahkan ke dalam labu pisah-250 ml. Tambah 15 ml air, aduk dan pindahkan larutan ke dalam labu pisah kedua, tambah 60 ml n-heksan dan aduk selama 15 menit. Buang lapisan air. Pada fase heksan, tambah 1 tetes fenolftalein, 15 ml air, dan asam asetat encer perlahan-lahan sampai netral. Biarkan selama 10 menit sampai lapisan terpisah dan buang lapisan air. Saring fase heksan dengan natrium sulfat anhidrat ke dalam botol 100 ml. Bilas penyaring dengan n-heksan dan campur hasil bilasan dalam botol yang sama. Uapkan fase heksan dengan rotavapor pada suhu 50°C sampai kering. Larutkan residu dengan 2 ml larutan pengekstrak dan alirkan ke dalam kolom silika ekstraksi fasa-padat (*solid phase extraction silica*). Elusi kolom dengan 10 ml larutan pengekstrak dan buang 1 ml eluat pertama, kemudian tampung eluat berikutnya. Hangatkan di atas penangas air pada suhu 42°C dan uapkan dengan aliran nitrogen. Larutkan residu dengan 2 ml asetonitril.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 10 µg kolekalsiferol atau ergokalsiferol, lakukan dengan cara yang sama seperti larutan standar, dimulai dengan "...tambah 15 ml air dan 15 ml larutan kalium hidroksida-alkohol".

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai, suhu 27°C.

Laju alir. 0,7 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 265 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara vitamin D yang terbentuk dan prekursor tidak kurang dari 10. dan simpangan baku relatif untuk tidak lebih dari 4%.

Injek 15 µl larutan standar dan larutan uji. Hitung kadar (µg) dari kolekalsiferol atau ergokalsiferol dengan rumus:

$$1,09 (2C) \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

1,09 = faktor-koreksi untuk menghitung jumlah previtamin D

C = konsentrasi larutan standar (µg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Vitamin E (α -tokoferol, α -tokoferil asetat, atau α -tokoferil suksinat)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan :

Fase gerak. Encerkan 10 ml asam fosfat dengan air sampai batas volume 1000 ml (larutan A). Campur metanol dan larutan A (95:5). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutkan sediaan α -tokoferol, α -tokoferil asetat, atau α -tokoferil suksinat dalam metanol sampai konsentrasi 2 mg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan standar ergokalsiferol dalam metanol sampai konsentrasi 0,65 mg/ml. Pindahkan 1 ml larutan ke dalam labu yang mengandung 100 mg α -tokoferil asetat. Larutkan dengan 30 ml metanol dan aduk. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan uji. Uapkan 20 ml larutan (yang diperoleh pada penetapan vitamin A, metode 1) pada suhu ruang dengan vakum sampai kering. Larutkan dan encerkan residu dengan metanol sampai konsentrasi 2 mg/ml.

Kolom. Oktadesilsilil 5 μ m, ukuran 10 cm x 8 mm.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Kesesuaian sistem. Waktu tambat relatif 0,5 untuk ergokalsiferol dan 1,0 untuk α -tokoferil asetat; resolusi antara ergokalsiferol dan α -tokoferil asetat tidak kurang dari 12; dan faktor tailing antara 0,8 sampai 1,2. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 100 μ l larutan standar dan larutan uji. Hitung kadar (μ g) dengan rumus:

$$CD \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

- C = konsentrasi standar (mg/ml)
 D = faktor pelarut (ml) untuk larutan uji
 A_S = area puncak larutan uji
 A_{Std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campur 240 ml metanol, 10 ml air, 0,5 ml asam fosfat 50%, encerkan dengan asetonitril sampai batas volume 1000 ml, aduk dan saring. Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan dan encerkan sediaan α -tokoferol, α -tokoferil asetat, dan α -tokoferil suksinat dalam metanol sampai konsentrasi 2 mg/ml.

Larutan standar. Larutan dan encerkan standar α -tokoferol, α -tokoferil asetat, atau α -tokoferil suk-

sinat dalam metanol sampai konsentrasi 2 mg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam penetapan vitamin A, metoda 2. Pindahkan supernatan 2,2,4-trimetilpentan ke dalam labu sampai konsentrasi setara dengan larutan standar. Uapkan sampai kering, tambah metanol, dan uapkan sisa 2,2,4-trimetilpentan. Encerkan dengan metanol dan aduk.

Kolom. Oktadesilsilil 5 μ m, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

Kesesuaian sistem. Waktu tambat relatif 0,6 untuk α -tokoferil suksinat, 0,8 untuk α -tokoferol, dan 1,0 untuk α -tokoferil asetat, berturut-turut; resolusi antara α -tokoferil suksinat dan α -tokoferol tidak kurang dari 4,0; dan resolusi antara α -tokoferol serta α -tokoferil asetat tidak kurang dari 3,0. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 25 μ l larutan standar dan larutan uji. Hitung kadar (μ g) dengan rumus :

$$26,5 \text{ CD} \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

- C = konsentrasi standar (mg/ml)
 D = faktor pelarut sebagai pengganti pelarut 2,2,4-trimetilpentan menjadi metanol
 A_S = area puncak larutan uji
 A_{Std} = area puncak larutan standar

[Ekstraksi awal pada 26,5 ml 2,2,4-trimetilpentan telah dibukukan dalam rumus] Hitung α -tokoferol setara dengan α -tokoferil asetat atau α -tokoferil suksinat dengan cara mengalikan jumlah (mg), oleh faktor 0,91 atau 0,81.

3. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan :

Pelarut. Campuran asetonitril dan etil asetat (1:1).

Fase gerak. Campuran metanol, asetonitril, dan n-heksan (46,5:46,5:7,0). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutan dan encerkan standar α -tokoferol, α -tokoferil asetat, atau α -tokoferil suksinat dalam metanol sampai konsentrasi 0,3 mg/ml.

Larutan uji. Sediaan setara dengan 8 mg α -tokoferol, ke dalam labu-125 ml. Tambah 25 ml air, 25 ml alkohol dehidrat dan 3,5 g kalium hidroksida. Aduk selama 1 jam dalam penangas air 55°C, dinginkan, dan pindahkan dengan bantuan 50 ml n-heksan ke dalam labu pisah-125 ml dan kocok selama 60 detik sampai lapisan terpisah. Pindahkan lapisan air ke dalam labu pisah-250 ml kedua, dan ulangi ekstraksi dengan 50 ml n-heksan. Buang lapisan air dan gabungkan ekstrak heksan. Bilas ekstraksi dengan 25 ml air sampai lapisan terpisah, dan buang lapisan air. Tambah 3 tetes asam asetat

glasial dan ulangi prosedur pembilasan sebanyak 2 kali. Saring hasil bilasan lapisan heksan dengan natrium sulfat anhidrat ke dalam botol-250 ml. Bilas corong dan natrium sulfat dengan n-heksan dan tambah hasil bilasan ke dalam larutan heksan dalam botol. Uapkan larutan heksan dalam penangas air pada suhu 50°C sampai kering. Segera tambah 25,0 ml pelarut dan aduk sampai residu larut.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai, suhu 40°C.

Laju alir. 3 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 291 nm.

Simpangan baku relatif. Tidak lebih dari 5%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$25 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Vitamin K₁ (fitonadion)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campuran metanol dan air (95:5). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan sediaan dalam metanol sampai konsentrasi 200 µg/ml (fitomenadion), jika perlu dengan bantuan sonikasi.

Larutan standar. Encerkan 10 ml larutan stok standar dengan metanol sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan 65 mg α-tokoferil asetat dengan 75 ml metanol, tambah 10 ml larutan stok standar, encerkan dengan metanol sampai batas volume 100 ml.

Larutan uji. Uapkan 20 ml larutan (yang diperoleh pada penetapan vitamin A) metode 1, pada suhu ruang dengan vakum sampai mendekati kering. Larutkan dan encerkan residu dengan metanol sampai konsentrasi fitomenadion 20 µg/ml.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 10 cm x 8 mm.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara α-tokoferil asetat dan fitonadion tidak kurang dari 5. Waktu retensi relatif 0,68 untuk α-tokoferil asetat dan 1,0 untuk fitonadion dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$C (LD) \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi standar sediaan (µg/ml)

L = jumlah fitomenadion pada sediaan (µg)

D = konsentrasi fitomennadion dalam larutan uji (µg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut. Campur metanol dan isopropanol (95:5).

Fase gerak. Campuran 800 ml metanol, 200 ml metilen klorida, 0,1 ml asam asetat glasial, 1,36 g seng klorida, dan 0,41 g natrium asetat.

Larutan standar internal. Larutan menakuinon 4 (vitamin K₂) dalam pelarut sampai konsentrasi 5 µg/ml. [Stok larutan menakuinon 4 (100 µg/ml) dapat disimpan selama 2 bulan dalam lemari pendingin.]

Larutan stok standar. Larutkan sediaan fitonadion dalam metilen klorida dengan bantuan sonikasi. Encerkan dengan pelarut sampai konsentrasi 5 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan 1 ml larutan stok standar dan 1 ml larutan standar internal dengan pelarut sampai volume 5,0 ml dan aduk. Saring dengan membran 0,45 µm atau yang sesuai.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 50 µg fitonadion, tambah 4 ml air, sumbat, dan aduk. Tempatkan tabung dalam penangas air pada suhu 60°C selama 5 menit. Buang rendaman dan aduk selama 1 menit biarkan larutan tetap panas. Tambah 8 ml alkohol dan aduk. Tempatkan tabung dalam penangas air pada suhu 60°C selama 5 menit. Buang rendaman, dan aduk selama 2 menit biarkan larutan tetap panas. Dinginkan pada suhu ruang. Encerkan dengan larutan standar internal setara dengan 5 µg/ml fitonadion. Tambah 20 ml petroleum benzin dan sumbat. Aduk selama 15 menit. Sentrifus untuk memisahkan kedua lapisan. Pindahkan lapisan atas dari petroleum benzin setara dengan 5—50 µg fitonadion ke dalam labu. Uapkan tabung dalam penangas air pada suhu 35°—45°C dengan aliran nitrogen sampai lemak residu hilang. Larutkan residu dalam pelarut sampai konsentrasi 1 µg/ml fitomenadion.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Paska kolom. Serbuk seng, ukuran 3 cm x 4,6 mm atau yang sesuai. [Siapkan reaktor pasca kolom jika diperlukan atur kesesuaian sistem].

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Fluorometer pada panjang Ex. 320 nm untuk Em. 420 nm.

Kesesuaian sistem. Waktu tambat relatif 1,0 untuk standar internal dan 1,4 untuk fitonadion; efisiensi kolom untuk puncak fitonadion tidak kurang dari 2500 plat teoritis; faktor tailing untuk puncak fitonadion tidak lebih dari 1,5; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 25 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$SCD \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi standar (µg/ml)

D = volume larutan standar internal yang digunakan untuk larutan uji (ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{std} = area puncak larutan standar

β-Karoten

Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan:

Larutan kalium hidroksida. Larutkan dan encerkan 58,8 g kalium hidroksida dalam air sampai batas volume 50 ml.

Larutan iodium. Larutkan 10 mg iodium dengan sikloheksan dan aduk. Encerkan 10 ml larutan dengan sikloheksan sampai batas volume 100 ml dan aduk. Larutan harus segar.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 2 mg β-karoten, tambah 100 ml alkohol, 6 ml larutan kalium hidroksida dan aduk. Panaskan dengan refluks kondensator selama 45 menit. Dinginkan pada suhu ruang, tambah 170 ml larutan heksan dan aduk selama 30 menit. Biarkan selama 5—10 menit. Pindahkan lapisan organik ke dalam labu 500 ml. Pada lapisan air, tambah 170 ml heksan dan aduk selama 20 menit. Biarkan selama 10 menit. Buang lapisan air dan campur lapisan organik. Pada fase organik, tambah 3 g natrium sulfat anhidrat dan aduk. Pindahkan larutan setara dengan 100 µg β-karoten ke dalam labu -50 ml. Uapkan dengan aliran nitrogen sampai kering dan segera tambah sikloheksan. Tambah 2 ml larutan iodium dan panaskan selama 15 menit dalam penangas air pada suhu 65°C. Dinginkan dan encerkan dengan sikloheksan, aduk.

Ukur serapan pada panjang gelombang maksimum 452 nm, gunakan sikloheksan sebagai blanko. Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$LD \left(\frac{A_s}{223} \right)$$

Keterangan :

L = jumlah β-karoten pada sediaan (mg)

D = konsentrasi β-karoten pada larutan uji (mg/ml)

A_s = serapan larutan uji

223 = serapan β-karoten pada panjang gelombang 452 nm

Asam askorbat, kalsium askorbat dan natrium askorbat

Pada sediaan setara dengan 100 mg asam askorbat, tambah 75 ml asam metafosfat asetat. Sumbat dan aduk selama 30 menit. Encerkan dengan air dan aduk. Sentrifus sampai supernatan. Pada 4 ml larutan, tambah 5 ml asam metafosfat-asetat dan titrasi dengan larutan standar diklorofenol-indofenol sampai warna merah muda tetap selama 5 detik. Standarisasi larutan diklorofenol-indofenol dengan campuran 5,5 ml asam metafosfat-asetat dan 15 ml air.

Vitamin H (biotin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan :

Larutan uji. Larutkan sediaan setara dengan 1 mg biotin dalam 3 ml dimetil sulfoksid, hangatkan di atas penagas air pada suhu 60°—70°C selama 5 menit. Sonikasi selama 5 menit dan encerkan dengan air sampai batas volume 200 ml,

Larutan standar. Larutkan dan encerkan 67 mg standar biotin dalam dimetilsulfoksid sampai batas volume 200 ml. Encerkan larutan dengan air sampai konsentrasi 5 µg/ml.

Kolom. Oktilsilil, 3-µm ukuran 15 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

Fase gerak. Campur 85 ml asetonitril, 1 g natrium perklorat, dan 1 ml asam fosfat, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, aduk, saring. Jika perlu buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Laju alir. 1,2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 200 nm.

Sistem kromatografik. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$200 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi biotin pada larutan standar (µg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode mikrobiologi, menggunakan:

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar biotin dalam alkohol 50% sampai konsentrasi 50 µg/ml dan aduk. Simpan larutan dalam lemari pendingin.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar dengan air sampai konsentrasi 0,1 ng/ml.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 100 µg biotin, tambah 3 ml alkohol 50%, dan aduk. Panaskan dalam penangas air pada suhu 60°–70°C selama 5 menit. Sonikasi selama 5 menit, encerkan dengan alkohol 50% sampai batas volume 200 ml dan saring. Encerkan larutan dengan air sampai konsentrasi 0,1 mg/ml.

Larutan asam-kasein hidrolisat. Campurkan 100 g vitamin bebas kasein dengan 500 ml asam hidroklorida 6M dan refluks selama 8–12 jam. Suling dengan pengurangan tekanan (untuk menghilangkan asam hidroklorida) sampai terbentuk pasta. Larutkan pasta dalam air, atur pH $3,5 \pm 0,1$ dengan natrium hidroksida 1M dan tambah air sampai batas volume 1000 ml. Tambah 20 g arang aktif, aduk selama 1 jam dan saring ke dalam botol. Ulangi proses dengan arang aktif. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

Larutan sistin-triptofan. Suspensikan 4,0 g L-sistin dalam 1,0 g L-triptofan (atau 2,0 g D,L-triptofan) dalam 700 ml air, panaskan pada suhu 70°–80°C, dan tambah secara perlahan larutan asam hidroklorida (1 dalam 2), aduk. Dinginkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

Larutan urasil-guanin-adenin. Larutkan 200 mg adenin sulfat, guanin hidroklorida, dan urasil dalam 10 ml asam hidroklorida 4M sambil dipanaskan, dinginkan, dan tambah air sampai batas volume 200 ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan polisorb 80. Larutkan dan encerkan 25 g polisorb 80 dalam alkohol sampai batas volume 250 ml.

Larutan kalsium pantotenat. Larutan kalsium pantotenat dalam alkohol 50% yang mengandung 10 µg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan riboflavin-tiamin hidroklorida. Larutan riboflavin dan tiamin hidroklorida dalam asam asetat 0,02 M yang mengandung 20 µg/ml riboflavin dan 10 µg/ml tiamin hidroklorida. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih 10°C.

Larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida. Campuran air dan alkohol netral (3:1) yang mengandung 10 µg/ml asam p-aminobenzoat, 50 µg/ml niasin dan 40 µg/ml piridoksin hidroklorida. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan garam 1. Larutkan dan encerkan 25 g kalium fosfat dan 25 g dikalium fosfat dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

Larutan garam 2. Larutkan dan encerkan 10 g magnesium sulfat, 0,5 g natrium klorida, 0,5 g besi sulfat dan 0,5 g mangan sulfat dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

Larutan basal stok medium. Campur 25 ml larutan asam-kasein hidrolisat, 25 ml larutan sistin-triptofan, 0,25 ml larutan polisorb 80, 10

g dekstrosa anhidrat, 5 g natrium asetat anhidrat, 5 ml larutan urasil-guanin-adenin, 5 ml larutan kalsium pantotenat, 5 ml larutan riboflavin-tiamin hidroklorida, 5 ml larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida, 5 ml larutan garam (1), 5 ml larutan garam (2), atur pH $6,8 \pm 0,1$ dengan natrium hidroksida 1M dan encerkan dengan air sampai batas volume 250 ml.

Stok kultur *Lactobacillus plantarum*. Larutkan 2 g sari ragi dalam 100 ml air, tambah 500 mg dekstrosa anhidrat, 500 mg natrium asetat anhidrat dan 1,5 g agar. Panaskan campuran di atas penangas air dengan pengadukan sampai agar larut. Pindahkan 10 ml larutan panas pada tabung uji, sumbat, sterilkan pada otoklaf 121°C selama 15 menit dan biarkan tabung sampai dingin dalam posisi tegak lurus. Siapkan kultur pada tiga atau lebih tabung, gunakan kultur murni *Lactobacillus plantarum*, inkubasi selama 16–24 jam pada suhu 30°–37°C dan tetap pada suhu $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Simpan dalam lemari pendingin. Siapkan stok kultur segar setiap minggunya dan jangan gunakan untuk inokulum jika kultur lebih dari 1 minggu.

Medium kultur. Setiap tabung uji mengandung 5 ml larutan basal stok medium, tambah 5 ml air yang mengandung 0,5 mg biotin. Sumbat dengan katun, sterilkan pada otoklaf 121°C selama 15 menit dan dinginkan.

Inokulum. [Suspensi beku *Lactobacillus plantarum* dapat digunakan sebagai stok kultur untuk menghasilkan inokulum yang sebanding dengan kultur segar]. Pindahkan secukupnya dari stok kultur *Lactobacillus plantarum* ke dalam tabung steril yang mengandung 10 ml medium kultur. Inkubasi pada suhu 30°–37°C selama 16–24 jam.

Prosedur. Siapkan enam tabung, tambah larutan standar ke setiap tabung yang berbeda masing-masing 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ml. Pada setiap tabung dan empat tabung kosong lain, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml. Pada empat tabung yang kosong, tambahkan larutan uji 2–3 kali larutan standar termasuk 2,0; 3,0; dan 4,0 ml. Pada setiap tabung, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml. Sumbat semua tabung, sterilkan pada otoklaf 121°C selama 5 menit. Dinginkan, tambah 1 tetes inokulum pada setiap tabung, kecuali dua dari empat tabung tidak mengandung larutan standar (blanko) dan aduk. Inkubasi pada suhu 30°–37°C selama 16–24 jam inkubasi. Dalam 2 jam pertama tidak terjadi kekeruhan dalam tabung yang mengandung standar dengan konsentrasi paling tinggi.

Ukur %T masing-masing tabung dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540–660 nm.

Perhitungan. Lakukan perhitungan dengan bantuan kurva konsentrasi-respon (%T) atau dengan bantuan program yang tersedia pada peralatan.

3. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Dapar. Pada 800 ml air dan 100 ml tritilamin, tambah 80 ml asam fosfat 85%, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk.

Fase gerak. Pada 80 ml asetonitril dan 10 ml dapar, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, aduk dan saring. Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutkan dan encerkan 25 mg standar biotin dengan air sampai batas volume 250 ml dan aduk. Pada 1,5 ml larutan, encerkan dengan air sampai konsentrasi 0,6 µg/ml biotin. [Gunakan sebagian larutan standar untuk penentuan angka temuan kembali pada prosedur ekstraksi fasa-padat (*solid phase extraction*)].

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan setara dengan 60 µg biotin dengan air (jika perlu sonikasi selama 30—40 menit) sampai batas volume 100 ml dan saring. Atur pH 6,0—7,0 dengan asam asetat atau natrium hidroksida 0,1 M.

Ekstraksi fasa-padat (*solid-phase extraction*). [Sebelum digunakan, bilas kolom dengan 2 ml metanol. Ekuilibrasikan dengan 2 ml air]: Pipet masing-masing 5 ml larutan uji dan larutan standar ke dalam kolom ekstraksi fasa-padat yang berbeda (mengandung penukar ion dan fase terbalik kopolimer N-vinilpirolidon dan divinilbenzen). Bilas kolom dengan 10 ml metanol (30% v/v). Alirkan sekita 4,9 ml pada metanol (30% v/v dalam asam hidroklorida 0,1 M) ke dalam kolom. Campur eluat ke dalam labu ukur-5 ml, yang mengandung 100 µl natrium asetat (40% v/v) dan encerkan dengan metanol (30% v/v dalam asam hidroklorida 0,1 M) sampai volume 5,0 ml.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 atau yang sesuai.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 200 nm.

Kesesuaian sistem. Faktor tailing tidak lebih dari 1,5; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 2%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi biotin dalam larutan standar (µg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Vitamin B₁₂ (sianokobalamin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campuran air dan metanol (65 : 35).

Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutkan standar sianokobalamin dalam air sampai konsentrasi 10 µg/ml. Encerkan stok larutan dengan air sampai konsentrasi 1 µg/ml.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan setara 100 µg sianokobalamin dengan air sampai batas volume 250 ml. Saring dan gunakan hasil saringan.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 15 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 0,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm.

Kesesuaian sistem. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 200 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi sianokobalamin dalam larutan standar (µg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode mikrobiologi, menggunakan:

Larutan stok standar sianokobalamin. Larutkan standar sianokobalamin dalam alkohol 25% sampai konsentrasi 1 µg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar sianokobalamin dengan air sampai konsentrasi 0,01 dan 0,04 ng/ml. Larutan harus segar.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 1,0 µg sianokobalamin, tambah 25 ml larutan pengekstrak (yang mengandung 1,29 g natrium fosfat dibasa, 1,1 g asam sitrat anhidrat dan 1 g natrium metabisulfit dalam 100 ml), otoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit. Saring atau sentrifus jika diperlukan. Encerkan hasil saringan atau supernatan dengan air sampai konsentrasi antara 0,01 dan 0,04 ng/ml.

Larutan asam kasein-hidrolisat. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 2.

Larutan asparagin. Larutkan dan encerkan 2,0 g L-asparagin dalam air sampai batas volume 200 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan adenin-guanin-urasil. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 2.

Larutan xantin. Larutkan 0,2 g xantin dalam sekitar 30 ml air, panaskan pada suhu 70°C, tambah 6 ml amonium hidroksida 6M dan aduk sampai larut. Dinginkan dan tambah air sampai batas

volume 200 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan garam 1. Larutkan dan encerkan 10 g kalium fosfat monobasa dan 10 g kalium fosfat dibasa dalam air sampai batas volume 200 ml dan tambah 2 tetes asam hidroklorida. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan garam 2. Larutkan 4 g magnesium sulfat, 0,2 g natrium klorida, 0,2 g besi sulfat dan 0,2 g mangan sulfat dalam air sampai batas volume 200 ml dan tambah 2 tetes asam hidroklorida. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan polisorbitat 80. Larutkan dan encerkan 20 g polisorbitat 80 dalam alkohol sampai batas volume 200 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan vitamin 1. Larutkan dan encerkan 10 mg riboflavin, 10 mg tiamin hidroklorida, 100 µg biotin dan 20 mg niasin dalam asam asetat glasial 0,02 M sampai volume 400 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan vitamin 2. Larutkan dan encerkan 20 mg asam p-aminobenzoat, 10 mg kalsium pantotenat, 40 mg piridoksin hidroklorida, 40 mg piridoksal hidroklorida, 8 mg piridoksamin dihidroklorida dan 2 mg asam folat dalam campuran air dan alkohol netral (3 : 1) sampai volume 400 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan basal stok medium. Larutkan bahan-bahan di bawah ini dalam asam hidroklorida secukupnya sampai larut. Tambah 100 ml air, aduk dan larutkan dekstrosa, natrium asetat dan asam askorbat. Saring, jika diperlukan, tambah larutan polisorbitat 80. Atur pH 5,5–6,0 dengan natrium hidroksida 1 M dan tambah air murni sampai batas volume 250 ml.

Komposisi medium. Campur 0,1 g L-sistin, 0,05 g L-triptofan, 10 ml asam hidroklorida 1 M, 5 ml larutan adenine-guanin-urasil, 5 ml larutan xantin, 10 ml larutan vitamin 1, 10 ml larutan vitamin 2, 5 ml larutan garam (1), 5 ml larutan garam (2), 5 ml larutan asparagin, 25 ml larutan asam kasein-hidrolisat, 10 g dekstrosa anhidrat, 5 g natrium asetat anhidrat, 1 g asam askorbat dan 5 ml larutan polisorbitat 80.

Jus tomat. Sentrifus jus tomat yang dijual secara komersial sampai kotoran hilang. Saring sampai diperoleh sampai diperoleh hasil saringan berwarna kekuning-kuningan. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Medium kultur. Larutkan 0,75 g sari ragi, 0,75 g pepton, 1 g dekstrosa anhidrat dan 0,2 g kalium fosfat monobasa dalam sekitar 60 ml air. Tambah 10 ml jus tomat dan 1 ml larutan polisorbitat 80. Atur pH 6,8 dengan natrium hidroksida 1 M dan tambah air sampai batas volume 100 ml. Pindahkan 10 ml larutan dalam tabung uji dan sumbat dengan katun. Sterilkan pada otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan dengan cepat untuk menghindari

perubahan warna yang dihasilkan dari medium yang terlalu panas.

Suspensi medium. Encerkan larutan basal stok medium dengan air dengan volume yang sama. Pindahkan 10 ml medium ke dalam tabung uji. Sterilkan pada otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan dengan cepat untuk menghindari perubahan warna yang dihasilkan dari medium yang terlalu panas.

Stokkultur *Lactobacillus leichmannii*. Inokulasikan *Lactobacillus leichmannii* ke dalam 10 ml medium kultur yang steril (mengandung 1–1,5 g agar/100 ml). Inkubasi pada suhu 30°–40°C selama 16–24 jam. Simpan dalam lemari pendingin. Gunakan stok kultur yang segar untuk penetapan kadar.

Inokulum. [Suspensi beku *Lactobacillus leichmannii* atau *Lactobacillus plantarum* dapat digunakan sebagai stok kultur untuk menghasilkan inokulum yang sebanding dengan kultur segar]. Pindahkan secukupnya dari stok kultur *Lactobacillus leichmannii* ke dalam tabung steril yang mengandung 10 ml medium kultur. Inkubasi pada suhu 30°–40°C selama 16–24 jam. Suspensikan biakan dalam 5 ml suspensi medium steril dan campur. Atur volume dengan garam fisiologis sehingga campuran 1 berbanding 20 mempunyai nilai %T = 70% pada panjang gelombang 530 nm, larutan garam fisiologis sebagai blanko. Encerkan larutan sampai 1 berbanding 400 menggunakan larutan stok basal medium.

Prosedur. Pada tabung terpisah, tambah masing-masing 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; dan 5,0 ml larutan standar. Pada setiap tabung tersebut dan empat tabung lain, tambah 5,0 ml larutan stok basal medium dan air sampai volume 10 ml. Pada tabung yang terpisah, tambah 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 dan 4,0 ml larutan uji. Pada setiap tabung tersebut dan empat tabung lain, tambah 5,0 ml larutan stok basal medium dan air sampai volume 10 ml. Sterilkan tabung dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 5 menit. Tambah 0,5 ml inokulum pada setiap tabung yang telah disiapkan, kecuali dua tabung untuk blanko. Inkubasi pada suhu 30°–40°C selama 16–24 jam. Panaskan tabung pada suhu 80°C selama 5 menit. Dinginkan pada suhu ruang.

Ukur %T dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm selama 30 detik.

Perhitungan. Lakukan perhitungan dengan bantuan kurva konsentrasi-respon (%T) atau dengan bantuan program yang tersedia pada peralatan.

Asam folat

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pereaksi (1). Larutan tetrabutylamonium hidroksida 25% dalam metanol.

Pereaksi (2). Larutkan dan encerkan 5 g asam pentetat dalam natrium hidroksida 1 M sampai batas volume 50 ml.

Fase gerak. Larutkan 2 g kalium fosfat monobasa dalam 650 ml air. Tambah 12 ml pereaksi (1), 7 ml asam fosfat 3 M dan 240 ml metanol. Dinginkan pada suhu ruang, atur pH 7,15 dengan asam fosfat dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, aduk dan saring. [Periksa kembali pH sebelum digunakan, jika diperlukan buat penyesuaian kandungan metanol dan air (1%—3%) pada fase gerak untuk memperoleh pemisahan dan garis dasar asam folat dan standar internal yang baik].

Larutan standar internal. Pada 40 mg metilparaben tambah 220 ml metanol aduk sampai larut. Larutkan 2 g kalium fosfat monobasa dalam 300 ml air. Campurkan kedalam larutan yang bersi metilparaben, tambah 300 ml air dan aduk. Tambah 19 ml pereaksi (1), 7 ml asam fosfat 3 M dan 30 ml pereaksi (2). Atur pH 9,8 dengan amonia. Alirkan nitrogen kedalam larutan selama 30 menit, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar asam folat dalam larutan standar internal sampai konsentrasi 0,2 mg/ml. Encerkan 2 ml dengan larutan standar internal sampai volume 25 ml dan aduk.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan setara dengan 0,4 mg asam folat dalam 25 ml larutan standar internal, aduk selama 10 menit, dan sentrifus. Saring supernatan dan gunakan hasil saringan untuk penetapan

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 30 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

Injek larutan standar, waktu tambat relatif sekitar 0,8 untuk asam folat dan 1,0 untuk metilparaben; simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 15 µl larutan standar, larutan standar internal dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$25 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi asam folat larutan standar, (mg/ml)

A_S dan A_{Std} = perbandingan area asam folat terhadap metilparaben pada larutan uji dan larutan standar

- Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pereaksi. Larutkan 7,5 g dinatrium edetat dalam 500 ml air (yang mengandung 10 ml amonium hidroksida).

Pelarut pengencer. Amonium hidroksida (60 µg/ml).

Fase gerak. Encerkan 0,4 ml tritilamin, 15 ml asam asetat glasial dan 350 ml metanol dengan natrium 1-heksansulfonat 0,008 M sampai batas volume 2000 ml dan saring. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar asam folat ke dalam pelarut pengencer sampai konsentrasi 60 µg/ml. Larutan harus segar.

Larutan standar. Pada 5 ml larutan stok standar, tambah 10 ml metanol dan 35 ml pereaksi. Aduk selama 15 menit di dalam penangas air pada suhu 60°C, dinginkan. Saring (buang beberapa ml hasil saringan pertama) dan gunakan hasil saringan.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 0,3 mg asam folat, tambah 10 ml metanol dan 35 ml pereaksi. Aduk selama 15 menit didalam penangas air pada suhu 60°C, dinginkan. Saring (buang beberapa ml hasil saringan pertama), gunakan hasil saringan.

Kolom. Oktilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm, suhu 59°C.

Kecepatan alir. 2 ml/menit

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 270 nm.

Injek larutan standar, Simpangan baku tidak lebih dari 2,0%.

Injek 5 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$45 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi asam folat dalam larutan standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Kalsium pantotenat

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

- Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campur air dan asam fosfat (1000 : 1). Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar internal. Larutkan 80 mg asam p-hidroksibenzoat dalam 3 ml alkohol. Tambah 50 ml air dan 7,1 g natrium fosfat dibasa. Encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk. Atur pH 6,7, dengan asam fosfat.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar kalsium pantotenat dengan larutan standar internal sampai konsentrasi 0,6 mg/ml.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 15 mg kalsium pantotenat, tambah 25 ml larutan standar

internal, aduk selama 10 menit. Sentrifus dan saring. Gunakan hasil saringan.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 3,9 mm.

Laju alir. 1,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 210 nm.

Injek larutan standar, waktu tambat relatif adalah 0,5 untuk kalsium pantotenat dan 1,0 untuk asam p-hidroksibenzoat; simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek larutan standar, Simpangan baku tidak lebih dari 2,0%.

Injek 10 µl larutan standar, larutan standar internal dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus :

$$25 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi kalsium pantotenat dalam larutan standar (mg/ml)

A_s dan A_{Std} = perbandingan area kalsium pantotenat terhadap parahidroksibenzoat pada larutan uji dan larutan standar

- Lakukan dengan metode mikrobiologi, menggunakan:

Larutan stok standar. Larutkan 50 mg kalsium pantotenat (sebelumnya dikeringkan dan disimpan dalam tempat gelap diatas fosfor pentoksida) dalam 500 ml air. Tambah 10 ml asam asetat 0,2 M, 100 ml larutan natrium asetat (1 dalam 60), dan encerkan dengan air sampai konsentrasi 50 µg/ml. Simpan botol dalam toluen di lemari pendingin.

Larutan standar. Eencerkan larutan stok standar dengan air sampai konsentrasi 0,01 – 0,04 µg/ml kalsium pantotenat.

Larutan uji. Larutkan sediaan setara 50 mg kalsium pantotenat dalam 500 ml air. Tambah 10 ml asam asetat 0,2 M, 100 ml larutan natrium asetat (1 dalam 60), encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan saring. Encerkan larutan sampai konsentrasi setara dengan larutan standar.

Larutan asam-kasein hidrolisat. Campurkan 100 g vitamin bebas kasein dengan 500 ml asam hidroklorida 6 M dan reflus selama 8–12 jam. Suling dengan pengurangan tekanan (untuk menghilangkan asam hidroklorida) sampai terbentuk pasta. Larutkan pasta dalam air, atur pH 3,5 ± 0,1 dengan natrium hidroksida 1 M dan tambah air sampai batas volume 1000 ml. Tambah 20 g arang aktif, aduk selama 1 jam dan saring ke dalam botol. Ulangi proses dengan arang aktif. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

Larutan sistin-triptofan. Suspensikan 4,0 g L-sistin dalam 1,0 g L-triptofan (atau 2,0 g D,L-triptofan) dalam sekitar 700 ml air, panaskan pada suhu 70°–80°C, tambah setetes demi setetes

larutan asam hidroklorida (1 dari 2), dan aduk. Dinginkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

Larutan urasil-guanin-adenin. Larutkan 200 mg adenin sulfat, guanin hidroklorida, dan urasil dalam 10 ml asam hidroklorida 4 M sambil dipanaskan, dinginkan, dan tambah air sampai batas volume 200 ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan polisorb 80. Larutkan dan encerkan 25 g polisorb 80 dalam alkohol sampai batas volume 250 ml.

Larutan riboflavin-tiamin hidroklorida-biotin. Larutan riboflavin dan tiamin hidroklorida dan biotin dalam asam asetat 0,02 M yang mengandung 20 µg/ml riboflavin dan 10 µg/ml tiamin hidroklorida dan 0,04 µg/ml biotin. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih 10°C.

Larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida. Campuran air dan alkohol netral (3:1) yang mengandung 10 µg/ml asam p-aminobenzoat, 50 µg/ml niasin dan 40 µg/ml piridoksin hidroklorida. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan garam 1. Larutkan dan encerkan 25 g kalium fosfat monobasa dan 25 g kalium fosfat dibasa dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

Larutan garam 2. Larutkan dan encerkan 10 g magnesium sulfat, 0,5 g natrium klorida, 0,5 g besi sulfat dan 0,5 g mangan sulfat dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

Stok kultur *lactobacillus plantarum*. Larutkan 2 g sari ragi dalam 100 ml air, tambah 500 mg dekstrosa anhidrat, 500 mg natrium asetat anhidrat dan 1,5 g agar. Panaskan campuran di atas penangas air dengan pengadukan sampai agar larut. Pindahkan 10 ml larutan panas pada tabung uji, sumbat, sterilkan pada otoklaf 121°C selama 15 menit dan biarkan tabung sampai dingin dalam posisi tegak lurus. Siapkan stok kultur pada tiga atau lebih tabung, gunakan kultur murni *lactobacillus plantarum*, inkubasi selama 16–24 jam pada suhu 30°–37°C. Simpan dalam lemari pendingin. Siapkan stok kultur segar setiap minggunya dan jangan gunakan untuk inokulum jika kultur lebih dari 1 minggu.

Medium kultur. Setiap tabung uji mengandung 5 ml larutan basal stok medium, tambah 5 ml air yang mengandung 0,5 mg kalsium pantotenat. Sumbat dengan katun, sterilkan dengan otoklaf 121°C dan dinginkan.

Inokulum. [Suspensi beku *lactobacillus plantarum* dapat digunakan sebagai stok kultur untuk menghasilkan inokulum yang sebanding dengan kultur segar]. Pindahkan secukupnya dari stok kultur *lactobacillus plantarum* ke dalam tabung steril yang mengandung 10 ml medium kultur.

Inkubasi pada suhu 30°—37°C selama 16—24 jam.

Larutan stok basal medium. Campur 25 ml larutan asam kasein hidrolisat, 25 ml larutan sistin-triptofan, 0,25 ml larutan polisorbitat 80, 10 g dekstrosa anhidrat, 5 g natrium asetat anhidrat, 5 ml larutan urasil-guanin-adenin, 5 ml larutan kalsium pantotenat, 5 ml larutan riboflavin-tiamin hidroklorida, 5 ml larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida, 5 ml larutan garam (1), 5 ml larutan garam (2), atur pH $6,8 \pm 0,1$ dengan natrium hidroksida 1 M dan encerkan dengan air sampai batas volume 250 ml.

Prosedur. Siapkan enam tabung, tambah ke setiap tabung yang berbeda 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ml larutan standar. Pada setiap tabung dan empat tabung kosong lain, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml.

Pada empat tabung yang kosong, tambahkan larutan uji 2—3 kali larutan standar termasuk 2,0; 3,0; dan 4,0 ml. Pada setiap tabung, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml.

Sumbat semua tabung, sterilkan pada otoklaf 121°C selama 5 menit. Dinginkan, tambah 1 tetes inokulum pada setiap tabung, kecuali dua dari empat tabung tidak mengandung larutan standar (blanko) dan aduk. Inkubasi pada suhu 30°—37°C selama 16—24 jam inkubasi. Dalam 2 jam pertama tidak terjadi kekeruhan dalam tabung yang mengandung standar dengan konsentrasi paling tinggi.

Ukur %T dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540—660 nm.

Perhitungan. Lakukan perhitungan dengan bantuan kurva konsentrasi-respon (%T) atau dengan bantuan program yang tersedia pada peralatan.

- Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Dapar fosfat. Larutkan dan encerkan 10 g kalium fosfat monobasa dalam air sampai batas volume 2000 ml. Atur pH 3,5 dengan sam fosfat.

Fase gerak. Campur dapar fosfat dan metanol (90:10). Jika perlu, lakukan penyesuaian jika diperlukan (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutan standar kalsium pantotenat dalam air sampai konsentrasi 0,25 mg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar dengan air sampai konsentrasi 40 µg/ml.

Larutan uji. Larutkan sediaan setara 10 mg kalsium pantotenat dengan 50 ml metanol, dan encerkan dengan air sampai batas volume 250 ml dan saring.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 3,9 mm, atau yang sesuai, suhu 50°C.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 205 nm.

Injek larutan standar, simpangan baku relative tidak lebih dari 3,0%.

Injek 25 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus:

$$250 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi kalsium pantotenat dalam larutan standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Niasin atau niasinamid, piridoksin hidroklorida, riboflavin dan tiamin hidroklorida

Vitamin B₃ (niasin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

- Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Larutan pengencer. Campur air, asetonitril, dan asam asetat glasial (94:5:1).

Fase gerak. Campur air, metanol, dan asam asetat glasial (73:27:1) yang mengandung 140 mg natrium 1-heksansulfonat per 100 ml. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Pada 80 mg standar niasinamid, 20 mg standar piridoksin hidroklorida, 20 mg standar riboflavin, dan 20 mg standar tiamin hidroklorida, tambah 180 ml larutan pengencer. Rendam labu dalam penangas air pada suhu 65°—70°C selama 10 menit sambil diaduk sampai larut. Dinginkan segera dalam air dingin selama 10 menit pada suhu ruang, encerkan dengan larutan pengencer sampai batas volume 200 ml dan aduk.

Larutan uji. Pada sediaan setara 10 mg niasinamid dan 2,5 mg setiap piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida, tambah 25 ml larutan pengencer, dan aduk selama 30 detik sampai larut. Rendam tabung sentrifus dalam penangas air pada suhu 65°—70°C, panaskan selama 5 menit, dan aduk selama 30 detik. Masukkan kembali tabung ke dalam penangas air, panaskan kembali selama 5 menit, dan aduk selama 30 detik. Saring larutan, dinginkan pada suhu ruang, dan gunakan saringan. [Catatan - gunakan saringan dalam jangka waktu 3 jam].

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 3,9 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

Injek larutan standar, waktu tambat relatif dari niasinamid, piridoksin, riboflavin, dan tiamin adalah sekitar 0,3; 0,5; 0,8; dan 1,0; simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 25 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$25 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi niasin dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Larutan pengekstrak. Pada 1 ml asam asetat glasial dan 2,5 g dinatrium edetat larutkan dan encerkan dengan air sampai bats volume 100 ml dan aduk. Campur larutan dengan metanol (75:25).

Fase gerak. Natrium asetat 0,1 M (larutkan 13,6 g natrium asetat ke dalam 1000 ml air. Atur pH 5,4 dengan asam asetat dan aduk. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi). Pada fase gerak, tambah metanol sampai konsentrasi 1%.

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar niasin dalam larutan pengekstrak sampai konsentrasi 1 mg/ml.

Larutan standar. Encerkan 5 ml stok standar dengan larutan pengeskrak sampai volume 25 ml.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 2 mg riboflavin atau setara dengan 2 mg piridoksin atau setara dengan 20 mg niasin atau niasinamid, tambah 100 ml larutan pengekstrak dan aduk selama 20 menit dalam penangas air pada suhu 70°—75°C, dan panaskan selama 20 menit. Aduk selama 30 detik, dinginkan pada suhu ruang dan saring. Gunakan hasil saringan.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%. Jika diperlukan, bilas kolom dengan metanol.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi niasin dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

3. Lakukan dengan metode kromatografi cair (untuk niasin atau niasinamida, piridoksin hidroklorida, riboflavin dan tiamin).

Pereaksi. Larutan 25 g dinatrium edetat dalam 1000 ml air.

Fase gerak. Pada 0,4 ml trietilamin, 15,0 ml asam asetat glasial dan 350 ml metanol, tambah natrium 1-heksansulfonat 0,008 M smpai batas volume 2000 ml dan aduk. Saring dan gunakan hasil saringan. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan standar niasin atau niasinamid, piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida dengan pereaksi (jika perlu, panaskan), sampai konsentrasi 1,5 mg/ml (niasin atau niasinamid), 0,24 mg/ml (piridoksin hidroklorida), 0,08 mg/ml (riboflavin) dan 0,24 mg/ml (tiamin hidroklorida).

Larutan standar. Pada 5 ml larutan stok standar, tambah 10 ml campuran metanol dan asam asetat glasial (9 : 1) dan 30 ml campuran metanol dan etilen glikol (1:1). Sumbat, aduk selama 15 menit dalam penangas air pada suhu 60°C, dan dinginkan. Saring dan buang beberapa ml hasil saringan pertama.

Larutan uji. Pada sediaan setara 7,5 mg niasin atau niasinamid, 1,2 mg piridoksin hidroklorida, 0,4 mg riboflavin, dan 1,2 mg tiamin hidroklorida. Tambah 10 ml campuran metanol dan asam asetat glasial (9:1), 30 ml campuran metanol dan etilen glikol (1 : 1). Sumbat dan aduk selama 15 menit dalam penangas air pada suhu 60°C, dan dinginkan. Saring dan buang beberapa ml hasil saringan pertama.

Kolom. Oktilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai. Suhu 50°C.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 270 nm.

Injek standar; simpangan baku relatif tidak lebih dari 2%.

Injek 5 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$40 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi niasin dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Vitamin B₃ (niasinamid)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan:

Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar niasin, metode 2, menggunakan: larutan pengekstrak, fase gerak, larutan stok standar, larutan standar, larutan uji, dan sistem kromatografik.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi niasinamid dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{std} = area puncak larutan standar

3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B₆ (piridoksin hidroklorida)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan:

Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar niasin, metode 2, menggunakan: larutan pengekstrak, fase gerak.

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar piridoksin hidroklorida dalam larutan pengekstrak sampai konsentrasi 0,1 mg/ml.

Larutan standar. Encerkan 5 ml larutan stok standar dengan larutan pengekstrak sampai volume 25 ml dan aduk.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin, metode 2.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm.

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus:

$$100 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi piridoksin hidroklorida dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{std} = area puncak larutan standar

3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B₂ (riboflavin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Larutan pengekstrak. Lihat metode 2 untuk niasin.

Fase gerak. Larutkan 6,8 g natrium asetat dalam 1000 ml air dan aduk. Campur larutan dengan metanol (65:35). Tambah 2 ml trietilamin, atur pH 5,2 dengan asam asetat glasial. Jika perlu, lakukan penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Pada 20 mg standar riboflavin, tambah 180 ml larutan pengekstrak dan panaskan selama 5 menit dalam penangas air pada suhu 65°–75°C dan aduk. (Jika diperlukan ulangi proses tersebut sampai larut). Dinginkan dalam air dingin pada suhu ruang, encerkan dengan larutan pengekstrak sampai batas volume 2000 ml dan aduk.

Larutan standar. Encerkan 5 ml larutan stok standar dengan larutan pengekstrak sampai volume 25 ml dan aduk.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin, metode 2.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek larutan standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi riboflavin dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{std} = area puncak larutan standar

3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B₁ (tiamin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Larutkan 1,88 g natrium 1-heksansulfonat dalam 1000 ml asam fosfat (0,1%). Campur larutan dengan asetonitril (92:18). Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar tiamin hidroklorida dalam asam hidroklorida 0,2 M sampai konsentrasi 0,1 mg/ml.

Larutan standar. Encerkan 5 ml larutan stok standar dengan asam hidroklorida 0,2 M sampai volume 25 ml.

Larutan uji. Larutkan sediaan setara dengan 2 mg tiamin dalam 100 ml asam hidroklorida 0,2 M, aduk selama 15 menit dan didihkan selama 30 menit.

Dinginkan pada suhu ruang, dan saring. Gunakan saringan.

Kolom. Okatadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi tiamin dalam larutan standar (mg/ml)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Besi

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan :

Larutan stok standar besi. Pada 100 mg standar besi larutkan dalam 25 ml asam hidroklorida 6 M, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk.

Larutan standar. Encerkan 2,0; 4,0; 5,0; 6,0 dan 8,0 ml larutan stok standar besi dengan air sampai konsentrasi 2,0; 4,0; 5,0; 6,0 dan 8,0 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 5 µg/ml dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

$$0,001 CD$$

Keterangan :

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji

Fluorida

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode volt-meter, menggunakan:

Larutan natrium asetat 3 M. Larutkan 408 g natrium asetat dalam 600 ml air labu -1000 ml. Biarkan larutan sampai ekuilibrium tercapai pada suhu ruang, encerkan dengan air sampai volume 1000 ml dan aduk. Atur pH 7,0 dengan asam asetat 7.

Larutan natrium sitrat. Larutkan 222 g natrium sitrat dalam 250 ml air, tambahkan 28 ml asam perklorat dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk.

Larutan stok standar fluorida. Pindahkan 1,105 g standar natrium fluorida (sebelumnya dikeringkan pada suhu 100°C selama 4 jam dan dinginkan dalam

desikator), ke dalam labu-1000 ml. Larutkan dan encerkan dengan air sampai konsentrasi 500 µg/ml.

Larutan stok intermediate -1. Pipet 20 ml larutan stok standar fluorida ke dalam labu -100 ml, encerkan dengan air sampai konsentrasi 100 µg/ml.

Larutan stok intermediate -2. Pipet 20 ml larutan stok standar fluorida ke dalam labu -100 ml, encerkan dengan air sampai konsentrasi 10 µg/ml.

Larutan standar. Pada lima labu - 100 ml yang terpisah, pindahkan 3,0; 5,0 dan 10,0 ml larutan stok intermediate-2 serta 5,0 dan 10,0 ml larutan stok intermediate-1. Untuk setiap labu, tambah 10 ml asam hidroklorida 1 M, 25 ml larutan natrium asetat 3 M dan 25 ml larutan natrium sitrat. Encerkan isi setiap labu dengan air sampai konsentrasi 0,3; 0,5; 1,0; 5,0 dan 10,0 µg/ml.

Larutan uji. Pindahkan sediaan setara dengan 200 µg fluorida, ke dalam labu -100 ml. Larutkan dalam 10 ml asam hidroklorida 1 M, 25 ml larutan natrium asetat 3 M, dan 25 ml larutan natrium sitrat, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Prosedur. Pada 50 ml larutan standar dan larutan uji pada gelas piala plastik terpisah,

Ukur potensial (lihat pH), dalam mV, larutan standar dan larutan uji, dengan pH meter mampu reproduktibilitas minimum ±0,2 mV dan lengkapi dengan elektroda spesifik untuk ion fluorida serta elektroda standar kalomel. [ketika pengukuran dilakukan, benamkan elektroda dalam larutan yang diaduk dengan magnetic stirrer selama 1—2 menit], dan catat potensial. Bilas dan keringkan elektroda antara pengukuran secara hati-hati untuk menghindari merusakkan kristal elektroda ion-spesifik]. Buat kurva respon standar dalam µg/ml dengan potensial dalam mV. Hitung konsentrasi, C (µg/ml), dari fluorida dalam larutan uji. Hitung kadar dari fluorida (mg) pada sediaan menggunakan rumus :

$$0,1 C$$

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Dapar pH 10. Tambah 214 ml natrium hidroksida 0,1 M ke 1000 ml natrium bikarbonat 0,05 M.

Fase gerak. Campur air, alkohol dan asam sulfat 0,1 M (175:20:5). Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar natrium fluorida dalam air sampai konsentrasi fluorida 100 µg/ml.

Larutan standar. [Kondisikan kolom ekstraksi fase-padat (*solid phase extraction*) dengan tekanan tidak lebih dari 5 mm air raksa: bilas kolom dengan metanol kemudian dengan dapar pH 10. Jangan biarkan puncak kolom kering]. Pindahkan 10 ml larutan stok standar ke dalam labu-100 ml. Tambah 75 ml air, atur pH 10,4 ± 0,1 dengan natrium hidroksida 0,1 M. Encerkan dengan air sampai batas volume

100 mldan aduk. Saring, buang 15 ml hasil saringan pertama. Pindahkan 25 ml hasil saringan ke dalam labu-50 ml, tambah 15 ml air atur pH 10,0 dengan natrium hidroksida 0,1 M. Encerkan dengan dapar pH 10 sampai volume 50 ml dan aduk. Elusikan sebagian larutan melalui kolom ekstraksi fasa-padat 3 ml berisi oktadesilsilil yang dihubungkan melalui satu adaptor ke kolom ekstraksi fasa-padat kedua berisi penukar ion sulfonil propil. Buang 3 ml eluat pertama, dan kumpulkan sisa eluat vial untuk injeksi ke kromatografi.

Larutan uji. Pindahkan sediaan setara dengan 1 mg fluorida ke labu pisah-100 ml, tambah 15 ml air dan aduk. Bilas sisi botol dengan 15 ml air dan biarkan selama 10 menit. Encerkan dengan air sekitar 85 ml, atur pH 10,4 ± 0,1 dengan natrium hidroksida 1 M, encerkan dengan air sampai batas volume 100 mldan aduk. Lakukan seperti dalam larutan standar, dimulai dengan ".....saring buang 15 ml hasil saringan pertama".

Kolom pelindung. Resin penukar ion dari stiren divinil benzen sulfonat, ukuran 3 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Kolom analitik. Resin penukar ion dari stiren divinil benzen sulfonat, ukuran 30 cm x 7,8 mm.

Laju alir. 0,5 ml/menit.

Detektor. Konduktivitas.

Injek larutan standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 2%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji ke dalam kromatograf dan ukur area puncak. Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$0,2 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi fluorida dalam larutan standar (µg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Fosfor

Lakukan dengan metode spektrofotometri, menggunakan:

Larutan asam sulfat. Tambahkan 37,5 ml asam sulfat ke dalam 100 ml air dan aduk.

Larutan standar amonium molibdat. Larutkan standar 12,5 g amonium molibdat dalam 150 ml air. Tambah 100 ml larutan asam sulfat dan aduk.

Larutan hidrokinon. Larutkan 0,5 g hidrokinon dalam 100 ml air dan tambahkan satu tetes asam sulfat.

Larutan natrium bisulfit. Larutkan 20 g natrium bisulfit dalam 100 ml air.

Larutan stok standar fosfor. Larutkan 4,395 g kalium fosfat monobasa (sebelumnya ikeringkan pada suhu 105°C selama 2 jam dan simpan dalam desikator) dalam air, tambah 6 ml asam sulfat sebagai pengawet,

encerkan dengan air sampai konsentrasi 1000 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan stok standar dalam air sampai konsentrasi konsentrasi 20 µg/ml.

Larutan uji. Pada sediaan setara 100 mg fosfor, tambah 25 ml asam nitrat, panaskan diatas plat panas selama 30 menit. Tambah 15 ml asam hidroklorida, dan lanjutkan pemanasan sampai larutan jernin. Dinginkan dan pindahkan isi ke dalam labu- 500 ml dengan bantuan air. Encerkan dengan air sampai batas volume 500 ml dan aduk. Encerkan 10 ml larutan dengan air sampai batas volume 100-ml dan aduk.

Hitung kadar (µg) dari fosfor pada tablet menggunakan rumus :

$$5 C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi molibdenum dalam larutan standar (µg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Iodium

Lakukan penetapan kadar dengan metode titrasi, menggunakan:

Air brom. Pada 20 ml brom dalam botol, tambah 100 ml air. Sumbat botol dan kocok. Biarkan selama 30 menit, dan gunakan supernatan.

Prosedur. Pindahkan sediaan setara 3 mg iodid, ke dalam krusibel nikel. Tambah 5 g natrium karbonat, 5 ml larutan natrium hidroksida (50% b/v) dan 10 ml alkohol, Panaskan krusibel di atas penangas air untuk menguapkan alkohol, kemudian kering kan crucible pada suhu 100°C selama 30 menit. Pindahkan krusibel dengan isinya ke dalam tungku perapian dan panaskan dengan suhu 500°C selama 15 menit. [Pemanasan diatas suhu 500°C mungkin diperlukan untuk, untuk memastikan perubahan menjadi karbondioksida sempurna dari semua bahan organik] Dinginkan krusibel, tambahkan 25 ml air, tutup krusibel dengan gelas arloji dan didihkan dengan pelahan-lahan selama 10 menit. Saring dan bilas krusibel dengan air mendidih, kumpulkan hasil-saringan dan air bilasan dalam gelas piala. Tambahkan asam fosfat sampai larutan netral terhadap metil jingga, kemudian tambahkan 1 ml asam fosfat. Tambahkan air brom berlebih dan didihkan larutan sampai tidak berwarna. Tambahkan beberapa kristal asam salisilat, dan dinginkan larutan sampai suhu 20°C. Tambah 1 ml asam fosfat dan 0,5 g kalium iodida, Titrasi iodium bebas menggunakan natrium tiosulfat 0,005 M, dan larutan kanji sebagai indikator sampai tidak berwarna. Hitung kadar (µg), iodium pada tablet menggunakan rumus:

$$\frac{105,8 VN}{0,005}$$

Keterangan :

V = volume (ml), dari natrium tiosulfat

M = molaritas natrium tiosulfat

Kalium

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan stok standar kalium. Larutkan dan encerkan 190,7 mg kalium klorida (sebelumnya dikeringkan pada suhu 105°C selama 2 jam) dengan air sampai konsentrasi 100 µg/ml.

Larutan standar. encerkan larutan stok standar kalium dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 10 µg/ml. Pindahkan masing-masing 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 dan 25,0 ml larutan standar pada labu-100 ml yang terpisah. Encerkan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 dan 2,5 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 1 µg/ml dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus :

$$0,001 CD$$

Keterangan :

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji

Kalsium

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan lantanum klorida. Larutkan 26,7 g lantanum klorida heptahidrat dalam asam hidroklorida 0,125 M sampai volume 100 ml.

Larutan stok standar kalsium. Pada 1,001 g kalsium karbonat (sebelumnya dikeringkan pada suhu 300°C selama 3 jam dan dinginkan dalam desikator selama 2 jam), larutkan dalam 25 ml asam hidroklorida 1 M. Didihkan untuk menghilangkan karbon dioksida, dan encerkan dengan air sampai konsentrasi kalsium 400 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar kalsium dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi kalsium 100 µg/ml. Pindahkan masing-masing 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 ml larutan standar. Tambah 1 ml larutan lantanum klorida, encerkan dengan air sampai konsentrasi kalsium 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 µg/ml.

Larutan uji. Pindahkan sediaan setara dengan 5 tablet ke dalam krusibel porselin. Panaskan pada 550°C selama 6—12 jam dan dinginkan. Tambah 60 ml asam hidroklorida dan didihkan di atas penangas air selama 30 menit sambil di bilas permukaan bagian dalam krusibel dengan asam hidroklorida 6 M. Dinginkan, dan pindahkan ke dalam labu 100 ml. Bilas krusibel dengan sedikit asam hidroklorida 6 M dan masukkan hasil bilasan ke dalam labu. Encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml, aduk, dan saring, buang 5 ml hasil saringan pertama. Encerkan larutan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 2 µg/ml, tambah 1 ml larutan lantanum klorida setiap 100 ml volume akhir.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus :

$$0,001 CD$$

Keterangan :

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji

Kromium

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan :

Larutan stok standar kromium. Larutkan dan encerkan 2,829 g kalium dikromat (sebelumnya dikeringkan pada suhu 120°C selama 4 jam), larutkan dan encerkan dengan air sampai konsentrasi kromium 1000 µg/ml. Simpan dalam botol politilen.

Larutan standar. Pada 10 ml larutan stok standar kromium, tambah 50 ml asam hidroklorida 6 M, encerkan dengan air sampai konsentrasi 10 µg/ml. Pindahkan 10 ml dan 20 ml larutan standar ke dalam labu -100 ml terpisah, dan pindahkan 15 ml dan 20 ml larutan standar ke dalam labu -50 ml terpisah. Encerkan empat labu terbut dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 1,0; 2,0; 3,0 dan 4,0 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 1 µg/ml dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus :

$$CD$$

Keterangan :

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji

Magnesium

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan :

Larutan lantanum klorida. Siapkan seperti dalam pengujian kalsium.

Larutan stok standar magnesium. Larutkan 1 g magnesium dalam 50 ml asam hidroklorida 6 M, encerkan dengan air sampai konsentrasi 1000 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan stok standar magnesium dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 20 µg/ml. Pindahkan 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 ml larutan standar kedalam labu -100 ml yang terpisah. Tambah 1 ml larutan lantanum klorida dan encerkan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 dan 0,6 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 0,4 µg/ml.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus :

$$0,001 CD$$

Keterangan :

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji

Mangan

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan stok standar mangan. Larutkan 1 g mangan dalam 20 ml asam nitrat, encerkan dengan asam hidroklorida 6 M sampai konsentrasi 1000 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan 10 ml larutan stok standar mangan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 50 µg/ml. Pindahkan 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 dan 4,0 ml larutan standar ke dalam labu terpisah dan encerkan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 dan 2,0 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 1 µg/ml dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus :

$$0,001 CD$$

Keterangan :

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji

Molibdenum

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut :

1. Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom menggunakan:

Larutan pengencer. Larutkan 40 g dari amonium klorida dalam 2000 ml air.

Larutan stok standar molibdenum. Larutkan 1 g molibdenum dalam 50 ml asam nitrat. Encerkan dengan air sampai konsentrasi 1000 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan 10 ml larutan stok standar molibdenum dengan air sampai konsentrasi 100 µg/ml. Pindahkan 2,0; 10,0 dan 25,0 ml larutan ke dalam labu terpisah, tambah 5 ml asam perklorat. Didihkan selama 15 menit, dinginkan pada suhu ruang, encerkan dengan larutan pengencer sampai konsentrasi 5,0; 10,0 dan 25,0 µg/ml.

Larutan uji. Larutkan sediaan setara 1000 µg molibdenum dalam 12 ml asam nitrat. Secara hati-hati aduk botol dan sonikasi selama 10 menit atau sampai larut. Didihkan larutan selama 15 menit dan dinginkan pada suhu ruang. Secara hati-hati tambahkan 8 ml asam perklorat, panaskan sampai asam perklorat tampak menguap, aduk botol untuk mengusir uap. Ulangi pemanasan dan aduk. Dinginkan pada suhu ruang. Pindahkan isi botol ke dalam labu -100 ml dengan bantuan larutan pengencer, encerkan dengan larutan pengencer sampai batas volume 100,0 ml dan aduk.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus :

$$0,001 CD$$

Keterangan :

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji

2. Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan:

Larutan natrium fluorida. Larutkan 10 g natrium fluoride dalam 200 ml air, aduk dan saring. Simpan dalam tabung politlen.

Larutan besi sulfat. Larutkan dan encerkan 498 mg besi sulfat dalam air sampai volume 100 ml.

Larutan kalium tiosianat. Larutkan dan encerkan 20 g kalium tiosianat dalam air sampai batas volume 100 ml.

Larutan timah (II) klorida 20%. Pada 40 g timah (II) klorida tambahkan 20 ml asam hidroklorida 6,5 M. Panaskan sampai larut. Dinginkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Larutan timah (II) klorida encer. Encerkan 4 ml larutan timah (II) klorida 20% dengan air sampai batas volume 100 ml. Larutan harus segar.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan 92 mg amonium molibdat dengan air sampai batas volume 500 ml, aduk. Encerkan 20 ml dengan air sampai konsentrasi 20 µg/ml.

Prosedur. Pindahkan sediaan setara 40 µg molibdenum, ke dalam gelas piala -200 ml (I). Pindahkan 2 ml larutan standar ke dalam gelas piala -200 ml (II). Tambah 20 ml asam nitrat. Tutup dengan gelas arloji, dan didihkan secara perlahan di atas plat panas selama 45 menit. Dinginkan pada suhu ruang, tambahkan 6 ml asam perklorat, tutup dengan gelas arloji dan lanjutkan pemanasan sampai larut sempurna yang ditunjukkan saat cairan tidak berwarna atau kekuningan. Jika diperlukan, tambahkan asam nitrat dan asam perklorat ke dalam gelas (I). Uapkan sampai kering. Bilas sisi gelas dan gelas arloji dengan air, dan tambahkan lebih banyak air sampai volume 50 ml. Didihkan selama beberapa menit dan dinginkan pada suhu ruang. Tambah 2 tetes metil jingga ke dalam gelas piala, dan netralkan dengan amonium hidroksida. Tambah 8,2 ml asam hidroklorida. Pindahkan isi gelas piala pada labu-100 ml yang terpisah. Bilas gelas dengan air, pindahkan hasil bilasan ke dalam masing-masing labu, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Pindahkan 50 ml setiap larutan dari gelas piala (I) dan (II) ke dalam labu pisah. Tambah 1 ml larutan natrium fluorida, 0,5 ml larutan besi sulfat, 4,0 ml larutan kalium tiosianat, 1,5 ml larutan timah (II) klorida 20% dan 15 ml amil alkohol dan aduk selama 1 menit. Biarkan sampai lapisan terpisah dan buang lapisan yang mengandung air. Tambahkan 25 ml timah (II) klorida encer ke dalam dan aduk selama 15 detik. Biarkan lapisan terpisah dan buang lapisan yang mengandung air.

Pindahkan fase organik ke dalam tabung sentrifus yang terpisah dan sentrifus 2000 rpm selama 10 menit.

Ukur serapan pada panjang gelombang 465 nm, gunakan amil alkohol sebagai blanko.

Hitung kadar (μg) dari molibdenum (Mo) pada tablet menggunakan rumus :

$$2 C \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi molibdenum dalam larutan standar ($\mu\text{g/ml}$)

A_s = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Selenium

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom menggunakan:

Larutan pengencer. Siapkan seperti dalam pengujian molibdenum, metode 1.

Larutan stok standar selenium. [Perhatian: selenium adalah beracun; tangani dengan hati-hati]. Larutkan 1 g selenium dalam volume minimum asam nitrat. Uapkan hingga kering, tambah 2 ml air dan uapkan hingga kering. Ulangi proses 3 kali. Larutkan residu dalam asam hidroklorida 3 M, pindahkan ke dalam labu-1000 ml, encerkan dengan asam hidroklorida 3 M sampai konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Larutan standar. Encerkan 10 ml larutan stok standar selenium dengan air konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$. Pindahkan 5,0; 10,0 dan 25,0 ml larutan standar pada labu-100 ml yang terpisah dan tambah 5 ml asam perklorat. Didihkan larutan selama 15 menit, dinginkan pada suhu ruang, encerkan dengan air sampai konsentrasi 5,0; 10,0 dan 25,0 $\mu\text{g/ml}$.

Larutan uji. Pada sediaan, setara dengan 1000 μg selenium, tambah 12 ml asam nitrat. Secara hati-hati aduk botol dan sonikasi selama 10 menit atau sampai larut. Didihkan larutan selama 15 menit dan dinginkan pada suhu ruang. Secara hati-hati tambahkan 8 ml asam perklorat, panaskan botol sampai terlihat asap dan aduk. Ulangi pemanasan dan aduk sampai larutan jernih. Dinginkan pada suhu ruang. Pindahkan ke dalam labu- 50 ml dengan bantuan larutan pengencer dan encerkan dengan larutan pengencer sampai volume 50 ml dan aduk.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

$$0,001 CD$$

Keterangan :

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji

2. Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan:

Asam hidroklorida. Encerkan 50 ml asam hidroklorida dengan air sampai batas volume 500 ml dan aduk.

Larutan amonium hidroksida 50%. Encerkan 250 ml amonium hidroksida dengan air sampai batas volume 500 ml dan aduk.

Pereaksi-1. Larutkan 4,5 g dinatrium edetat dalam 400 ml air, tambah 12,5 g hidroksilamin hidroklorida, encerkan dengan air sampai batas volume 500 ml dan aduk.

Pereaksi-2. Pada 200 mg 2,3-diaminonaftalen tambah 200 ml asam hidroklorida 0,1 M. Ekstraksi 3 kali, masing-masing 40 ml sikloheksan dan buang lapisan sikloheksan. Saring larutan ke dalam botol coklat dan tutup larutan dengan lapisan 1-cm sikloheksan. Larutan ini stabil selama 1 minggu jika disimpan dalam lemari pendingin.

Larutan stok standar. [Perhatian: selenium adalah beracun; tangani dengan hati-hati]. Larutkan 1 g selenium dalam volume minimum asam nitrat. Uapkan hingga kering, tambahkan 2 ml air, dan uapkan hingga kering. Ulangi proses ini tiga kali. Larutkan residu dalam asam hidroklorida 3 M, pindahkan ke dalam labu-1000 ml, encerkan dengan asam hidroklorida 3 M sampai konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$. Encerkan larutan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

Larutan uji. Pada sediaan setara 20 μg selenium, tambah 10 ml asam nitrat, dan hangatkan di atas plat panas. Lanjutkan pemanasan sampai reaksi awal asam nitrat telah surut, kemudian tambahkan 3 ml asam perklorat. [Perhatian; hati-hati pada tahap karena reaksi asam perklorat bias kuat]. Lanjutkan pemanasan di atas plat panas sampai muncul uap. Tambah 0,5 ml asam nitrat dan panaskan kembali, tambah kembali sejumlah asam nitrat, larutan menjadi gelap. Panaskan selama 10 menit setelah muncul uap atau sampai larutan tidak berwarna. Dinginkan botol tambah 2,5 ml larutan asam hidroklorida dan panaskan diatas plat panas untuk mengeluarkan sisa asam nitrat. Panaskan campuran selama 3 menit setelah mulai mendidih. Dinginkan pada suhu ruang, dan encerkan dengan air sampai volume 20 ml.

Prosedur. Pada 10 ml larutan stok standar, tambah 1 ml asam perklorat dan 1 ml asam hidroklorida dan encerkan dengan air sampai volume 20 ml (larutan standar). Siapkan blanko dengan 1 ml asam perklorat dan 1 ml larutan asam hidroklorida dan encerkan dengan air sampai volume 20 ml. Perlakukan larutan uji, larutan standar dan blanko sebagai berikut: Tambahkan 5 ml pereaksi-1, dan aduk, atur pH $1,1 \pm 0,1$ dengan amonium hidroksida 50%. Tambah 5 ml pereaksi-2 dan aduk dengan. Tempatkan larutan diatas penangas air pada suhu 50°C , dan ekuilibrase selama 30 menit (lindungi dari cahaya). Dinginkan pada suhu ruang, dan pindahkan kedalam labu pan pada panjang gelombang pisah. Tambah 10 ml sikloheksan ke dalam setiap labu dan ekstrak selama 1 menit. Buang lapisan yang mengandung air. Sentrifus fase sikloheksan pada 1000 rpm selama 1 menit untuk sisa air.

Ukur serapan pada panjang gelombang 380 nm. Hitung kadar (μg) dari selenium (Se) pada sediaan menggunakan rumus :

$$CD \left(\frac{A_s}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

- C = konsentrasi selenium dalam larutan stok standar ($\mu\text{g/ml}$)
 D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji
 A_s = area puncak larutan uji
 A_{Std} = area puncak larutan standar

Seng

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan stok standar seng. Pada 311 mg standar seng oksida tambah 80 ml asam hidroklorida 5 M, hangatkan jika diperlukan sampai larut. Dinginkan dan encerkan dengan air sampai 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar seng dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$. Pindahkan 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ml ke dalam labu – 100 ml terpisah. Encerkan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 dan 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 2 $\mu\text{g/ml}$ dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

$$0,001 CD$$

Keterangan :

- D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji

Tembaga

Lakukan penetapan kadar menggunakan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan :

Larutan stok standar tembaga. Larutkan 1 g kertas perak dalam volume kecil asam nitrat (50% v/v), dan encerkan dengan larutan asam nitrat (1% v/v) sampai bats volume 1000 ml. (1000 $\mu\text{g/ml}$).

Larutan standar. Pada 10 ml larutan stok standar tembaga encerkan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$. Pada labu – 200 ml terpisah, pindahkan 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 dan 8,0 ml larutan standar, encerkan dengan air sampai konsentrasi 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 dan 4,0 $\mu\text{g/ml}$.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 2 $\mu\text{g/ml}$ dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus :

$$0,001 CD$$

Keterangan :

- D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji

Penyimpanan

Disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi. 2) Jenis sediaan. 3) Indikasi. 4) Waktu kadaluwarsa. 5) Kondisi penyimpanan.

Vitamin Larut Lemak

Vitamin Larut Lemak Kapsul

Definisi

Vitamin larut lemak dalam sediaan kapsul mengandung dua atau lebih vitamin larut lemak yaitu: vitamin A, vitamin D sebagai ergokalsiferol (vitamin D_2) atau kolekalsiferol (vitamin D_3), vitamin E, fitonadion (vitamin K_1), dan β -karoten. Dapat mengandung zat lain yang tertera di label dengan jumlah yang akurat.

Kapsul memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan kapsul dan persyaratan berikut:

Mengandung tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera pada vitamin A ($C_{20}H_{30}O$) sebagai retinol atau ester retinol dalam bentuk retinil asetat ($C_{22}H_{32}O_2$) atau retinil palmitat ($C_{36}H_{46}O_2$), vitamin D sebagai kolekalsiferol ($C_{27}H_{44}O$) atau ergokalsiferol ($C_{28}H_{44}O$), vitamin E sebagai α -tokoferol ($C_{29}H_{50}O_2$), α -tokoferil asetat ($C_{31}H_{52}O_3$), atau α -tokoferil suksinat ($C_{33}H_{54}O_5$), fitonadion ($C_{31}H_{46}O_2$), dan β -karoten ($C_{40}H_{56}$).

Identifikasi

Lakukan seperti pada penetapan kadar.

Waktu hancur. Memenuhi persyaratan untuk waktu hancur.

Keseragaman berat. Memenuhi persyaratan.

Catatan. Dalam penetapan kadar berikut, dimana lebih dari satu metode penetapan kadar digunakan untuk zat aktif tunggal, persyaratan dipenuhi dengan salah satu metode yang telah ditentukan.

Penetapan kadar

Vitamin A (retinol)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin A, metoda 1 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin A, metoda 2 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).

- Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin A, metoda 3 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).

Vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

- Lakukan seperti dalam penetapan kadar kolekalsiferol atau ergokalsiferol (vitamin D), metoda 1 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).
- Lakukan seperti dalam penetapan kadar kolekalsiferol atau ergokalsiferol (vitamin D), metoda 2 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).
- Lakukan seperti dalam penetapan kadar kolekalsiferol atau ergokalsiferol (vitamin D), metoda 3 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).

Vitamin E (α -tokoferol, α -tokoferil asetat, atau α -tokoferil suksinat)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

- Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin E, metoda 1 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).
- Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin E, metoda 2 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).
- Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin E, metoda 3 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).

Vitamin K (fitonadion)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

- Lakukan seperti dalam penetapan kadar fitonadion, metoda 1 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).
- Lakukan seperti dalam penetapan kadar fitonadion, metoda 2 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).

β -Karoten

Lakukan seperti dalam penetapan kadar β -karoten (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).

Penyimpanan

Disimpan dalam wadah, tertutup rapat dan terlindung dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi, 2) Jenis sediaan, 3) Indikasi, 4) Waktu kadaluwarsa, 5) Kondisi penyimpanan.

Vitamin Larut Lemak Tablet

Definisi

Vitamin larut lemak dalam sediaan tablet mengandung dua atau lebih vitamin larut lemak yaitu: vitamin A, vitamin D sebagai ergokalsiferol (vitamin D₂) atau kolekalsiferol (vitamin D₃), vitamin E, fitonadion

(vitamin K₁), dan β -karoten. Dapat mengandung zat lain yang tertera di label dengan jumlah yang akurat.

Tablet memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan tablet dan persyaratan berikut:

Mengandung tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera pada vitamin A (C₂₀H₃₀O) sebagai retinol atau ester retinol dalam bentuk retinil asetat (C₂₂H₃₂O₂) atau retinil palmitat (C₃₆H₄₆O₂), vitamin D sebagai kolekalsiferol (C₂₇H₄₄O) atau ergokalsiferol (C₂₈H₄₄O), vitamin E sebagai α -tokoferol (C₂₉H₅₀O₂), α -tokoferil asetat (C₃₁H₅₂O₃), atau α -tokoferil suksinat (C₃₃H₅₄O₅), fitonadion (C₃₁H₄₆O₂), dan β -karoten (C₄₀H₅₆).

Identifikasi

Lakukan seperti pada penetapan kadar.

Waktu hancur. Memenuhi persyaratan untuk waktu hancur.

Keseragaman berat. Memenuhi persyaratan.

Catatan. Dalam penetapan kadar berikut, dimana lebih dari satu metode penetapan kadar digunakan untuk zat aktif tunggal, persyaratan dipenuhi dengan salah satu metode yang telah ditentukan.

Penetapan kadar

Vitamin A (retinol)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

- Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin A, metoda 1 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).
- Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin A, metoda 2 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).
- Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin A, metoda 3 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).

Vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

- Lakukan seperti dalam penetapan kadar kolekalsiferol atau ergokalsiferol (vitamin D), metoda 1 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).
- Lakukan seperti dalam penetapan kadar kolekalsiferol atau ergokalsiferol (vitamin D), metoda 2 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).
- Lakukan seperti dalam penetapan kadar kolekalsiferol atau ergokalsiferol (vitamin D), metoda 3 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).

Vitamin E (α -tokoferol, α -tokoferil asetat, atau α -tokoferil suksinat)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

- Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin E, metoda 1 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).
- Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin

E, metoda 2 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).

3. Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin E, metoda 3 (vitamin larut air dan lemak dengan mineral tablet).

Vitamin K (fitonadion)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti dalam penetapan kadar fitonadion, metoda 1 (vitamin larut air, lemak dan mineral tablet).
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar fitonadion, metoda 2 (vitamin larut air, lemak dan mineral tablet).

β -Karoten

Lakukan seperti dalam penetapan kadar β -karoten (vitamin larut air, lemak dan mineral tablet).

Penyimpanan

Dilindungi dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi, 2) Jenis sediaan, 3) Indikasi, 4) Waktu kadaluwarsa, 5) Kondisi penyimpanan.

LAMPIRAN

Elektroforesis

Elektroforesis adalah metode analisis fisika yang didasarkan atas perpindahan partikel bermuatan terlarut atau terdispersi, akibat pengaruh medan listrik. Mobilitas elektroforetik adalah laju perpindahan partikel bermuatan dalam cm per detik yang disebabkan karena pengaruh medan listrik 1 V/cm, dinyatakan dalam $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{S}^{-1}$

Mobilitas dapat ditetapkan hanya untuk elektrolit tertentu pada kondisi pengujian yang tepat. Mobilitas dipengaruhi berbagai faktor antara lain:

1. Karakteristik partikel bermuatan; sifat, ukuran, bentuk muatan listrik dan koefisien gesek;
2. Cairan tempat partikel bermuatan bergerak, pelarut, sifat dan kadar elektrolit penghantar, kekuatan ion, pH dan kekentalan larutan.

Arah gerak partikel bermuatan tergantung dalam sifat muatan listrik; partikel bermuatan akan menuju ke arah elektroda yang bermuatan berlawanan. Laju migrasi tergantung pada empat faktor utama, yaitu mobilitas partikel bermuatan, aliran elektroendosmotik, penguapan dan kekuatan medan listrik. Oleh karena itu analisa elektroforesis harus dilakukan pada kondisi pengujian yang benar-benar tertentu dan jika mungkin menggunakan standar.

Elektroforesis Kertas

Peralatan

Generator listrik. Arus searah, tegangan tidak kurang dari 450 volt pada 150 mA, dilengkapi dengan voltmeter dan ampermeter.

Bejana. Persegi panjang ukuran panjang 50 cm, lebar 38 cm dan tebal 4,5 cm, terbuat dari kaca atau bahan lain yang sesuai. Pada kedua ujung bejana dipasang kabel listrik terisolasi yang menembus dinding bejana, ujung kabel dipasang alat penyambung untuk menempatkan elektroda platina dan ujung lain dihubungkan dengan generator. Bejana dilengkapi alat pengaman untuk memutus arus listrik jika tutup dibuka. Dua buah bak beruang dua, panjang 37 cm, lebar 5 cm dan tebal 2 cm dengan penyekat di tengahnya dimasukkan ke dalam bejana, masing-masing pada ujung bejana. Bak dapat juga dimasukkan ke dalam bejana, masing-masing pada ujung bejana. Bak dapat juga merupakan bagian dari bejana. Elektroda diletakkan memanjang pada luar ruangan luar bak terbenam seluruhnya dalam larutan dapar.

Alat penyangga. Terdiri dari dua lempeng kaca atau plastik iner, permukaan rata dan jarak kedua lempeng diatur sesampai difusi kapiler larutan dapat sekecil mungkin.

Kertas elektroforesis. Kertas filter Whatman 3 mm atau kertas filter lain yang sesuai, yang sebelumnya telah dicuci secara kromatografi. dengan campuran 2 bagian volume aseton dan 1 bagian volume air selama 16 jam. Setelah dikeringkan dipotong dengan ukuran panjang

30 cm, lebar 5 cm dan ditarik garis dasar melintang 13 cm dari salah satu ujungnya.

Prosedur

Isi kedua bak dengan larutan dapar yang tertera pada monografi. Letakkan potongan kertas yang telah disiapkan ke dalam kedua bak sesampai membentuk jembatan antara ruangan luar dan ruangan dalam kedua bak tersebut. Elektroda harus terbenam seluruhnya dalam larutan dapar yang terdapat tiap ruang luar bak. Totolkan masing-masing volume larutan yang tertera pada monografi pada garis dasar dengan jarak tidak kurang dari 2,5 cm, mulai dari 1 cm pinggir kertas. Biarkan pengering, tempatkan ujung kertas yang terdekat dengan garis dasar ke dalam ruang dalam bak yang di hubungkan dengan anode dan ujung lainnya ke dalam ruang dalam bak yang dihubungkan dengan katode. Basahi kertas dengan larutan dapar menggunakan kuas mulai dari ujung kertas ke arah garis dasar, kecuali bagian kertas yang mengandung zat uji. Tutup bejana, biarkan larutan dapar merembes melewati garis dasar. Seluruh instrumen terlindung dari cahaya. Hubungkan kabel dengan generator, alirkan listrik, atur tegangan sampai 20 volt/cm panjang kertas yang terletak di antara kedua bak, biarkan selama waktu yang ditetapkan atau sampai zat yang ditandai telah mencapai jarak yang ditentukan. Matikan generator, angkat kertas, keringkan di tempat gelap dengan aliran udara, amati dengan lampu ultraviolet pada panjang gelombang maksimum lebih kurang 254 nm. Jika menggunakan zat yang ditandai, pengujian hanya berlaku bila bercak tambahan larutan uji kurang dari intensitas bercak larutan standar, zat uji memenuhi syarat. Jika dikehendaki monografi, semprot merata kedua sisi kertas dengan pereaksi yang sama atas bercak yang dihasilkan.

Elektroforesis Agar Gel

Peralatan

Generator. Listrik tegangan tinggi.

Lempeng. Logam berongga untuk mengalirkan cairan pendingin, permukaan atas dibuat sedemikian sampai memungkinkan lempeng kaca setebal 6 mm pembawa media padat melekat dengan baik. Pada setiap ujung lempeng ditempatkan sepasang bak berisi media cair. Seluruh instrumen berada dalam kotak tertutup, tetapi ada aliran udara untuk mencegah kondensasi uap atau mengeringnya lapisan media padat.

Pereaksi

Medium agar pepton. Pepton 6 g, kasiton 4 g, ekstrak ragi 3 g, kaldu 1,5 g, glukosa 1 g, agar 15 g, air secukupnya sampai 1000 ml. Sterilkan. Atur pH 6,5 dengan asam hidroklorida 0,1 N segera sebelum digunakan.

Medium cair pepton. Buat menurut cara yang tertera pada medium agar pepton tanpa agar.

Dapar fosfat pH 6,5. Larutkan 1,76 g natrium hidrogen fosfat dan 2,43 g natrium dihidrogen fosfat dalam air secukupnya sampai 1000 ml.

Inokulum organisme. Biakan *Bacillus subtilis* selama 7 hari pada suhu 37°–39°C pada permukaan medium agar pepton yang telah ditambah mangan sulfat 0,001%. Cuci medium dengan air steril, encerkan cairan dengan air steril sampai mengandung 10–100 juta spora/ml. Untuk persediaan, simpan pada suhu tidak lebih dari 4°C.

Prosedur

Letakkan bingkai logam atau plastik yang sesuai di atas lempeng kaca, patri sisi bagian dalam lempeng dengan sedikit medium cair agar pepton, letakkan lempeng pada dasar rata tuangkan medium agar pepton yang sebelumnya telah diinokulasi dengan 1% v/v inokulum *B. subtilis* secukupnya sampai 1,6 mm. Biarkan medium membeku, angkat bingkai lubang medium dengan diameter lebih kurang 1 mm sebanyak 32 lubang sampai larutan dapat diatur dalam pola kuadrat Latin atau dalam pola blok rawu. Pipet masing-masing 5 µl 4 larutan yang ditetapkan dalam monografi ke dalam lubang yang sesuai dengan pola yang dipilih. Pindahkan lempeng ke dalam alat elektroforesis dan usahakan supaya lempeng mendatar. Isi tiap bak dengan sejumlah volume sama medium pepton cair, hubungkan isi masing-masing ruang dalam bak dengan medium pepton pada lempeng menggunakan sumbu terbuat dari 2 helai kain jerap tipis; bagian akhir sumbu sepanjang 2 cm harus melewati medium padat, tekan hati-hati sampai menyentuh. Tutup wadah, alirkan listrik dengan tegangan 15 volt sampai 20 volt/cm panjang lapisan medium agar pepton, sebaliknya menggunakan stabilisator.

Selama proses elektroforesis, alirkan air atau cairan pendingin lain yang sesuai melewati lempeng logam untuk menjaga supaya suhu tidak lebih dari 15°C. Dalam udara kelembaban tinggi, dapat terjadi kondensasi pada permukaan lapisan medium agar pepton, jika aliran udara dalam wadah pendingin tidak diperhatikan. Setelah terjadi pemisahan zat uji, matikan generator, pindahkan lempeng kaca tutup, inkubasi selama 18 jam pada suhu antara 30°C dan 35°C sambil dijaga agar lapisan medium tidak menjadi kering. Ukur diameter hambatan larutan standar dan daerah hambatan larutan uji. Hitung kadar zat uji.

Fluorometri

Intensitas sinar yang dipancarkan oleh suatu larutan yang berfluoresensi dalam batas tertentu merupakan fungsi dari kadar zat yang dilarutkan. Oleh karena itu dapat digunakan untuk penetapan kadar. Pada umumnya sinar yang dipancarkan oleh larutan berfluoresensi mempunyai intensitas maksimum pada panjang gelombang yang 20 nm sampai 30 nm lebih besar dari panjang gelombang pita penyerapan sinar yang membangkitkannya.

Pada fluorometri larutan zat disinari dengan sinar yang panjang gelombangnya di sekitar panjang gelombang penyerapan maksimum yang berasal

dari lampu raksa atau, lampu pijar yang telah disekat dengan filter. Intensitas fluoresensi diukur atau dibandingkan dengan intensitas fluoresensi larutan standar. Sinar fluoresensi dibebaskan dari sinar hamburan dengan melewati sinar melalui filter atau monokromator. Cara pengukuran pada dasarnya sama dengan cara pada spektrofotometri. Karena zat organik yang berfluoresensi mungkin terurai secara fotokimia, penyinaran harus dilakukan sesingkat mungkin.

Oleh karena daerah di mana intensitas fluoresensi sebanding dengan kadar umumnya sangat sempit, maka perbandingan $(c-d)/(a-b)$ tidak boleh kurang dari 0,40 dan tidak boleh lebih dari 2,50; a adalah pembacaan intensitas fluoresensi larutan standar, b adalah pembacaan intensitas fluoresensi larutan blanko untuk zat standar, c adalah pembacaan intensitas fluoresensi larutan uji dan d adalah pembacaan intensitas fluoresensi larutan blanko untuk zat uji. Sebagai zat standar dapat digunakan zat yang sama dengan zat uji dalam keadaan murni atau zat murni lain yang mempunyai pita penyerapan dan fluoresensi yang sama dengan zat uji. Misalnya larutan kinina dalam asam sulfat sering digunakan sebagai zat standar untuk fluoresensi biru dan larutan natrium fluoreoseina untuk zat yang berfluoresensi hijau.

Fotometri Nyala

Cara berikut digunakan untuk pemeriksaan fotometri nyala baik yang berdasarkan serapan atom maupun spektrum emisi, sesuai dengan yang tertera pada monografi.

Pereaksi

Air. Untuk penetapan kalium, kalsium, natrium dan seng gunakan air yang sebelumnya telah dilewatkan melalui penukar ion Amberlite MB I atau penukar ion lain yang sesuai.

Larutan kalium. Larutkan 1,1440 g kalium klorida yang sebelumnya telah dikeringkan pada suhu 130°C sampai bobot tetap, dalam air sampai batas volume 1000,0 ml; larutan mengandung K 600 µg/ml.

Larutan kalsium. Larutkan 1,001 g kalsium karbonat yang sebelumnya telah dikeringkan pada suhu 105°C sampai bobot tetap, dalam 25 ml asam hidroklorida 1 M, didihkan sampai karbondioksida hilang, tambahkan air bebas karbondioksida secukupnya sampai 1000,0 ml; larutan mengandung C 400 µg/ml.

Larutan natrium. Larutkan 508,40 natrium klorida yang selumnya telah dikeringkan pada suhu 130°C sampai bobot tetap, dalam air sampai batas volume 1000,0 ml; larutan mengandung Na 200 µg/ml.

Larutan seng. Larutkan 2,5 g seng butir dalam 20 ml asam klorida 5 N, tambahkan air secukupnya sampai 500,0 ml; larutan mengandung Zn 5 mg/ml.

Prosedur

Kecuali dinyatakan lain, gunakan salah satu cara berikut ini:

Prosedur I

Buat tidak kurang dari 3 larutan standar yang mengandung unsur yang diuji dalam batas kadar yang sesuai dengan alat yang digunakan. Tiap pereaksi yang digunakan dalam menyiapkan larutan uji harus ditambahkan dalam kadar yang sama ke dalam larutan standar. Siapkan alat untuk pengamatan serapan atom atau spektrum emisi sesuai dengan petunjuk. Pilih filter yang sesuai atau atur monokromator pada panjang gelombang seperti yang tertera pada monografi.

Untuk pengukuran emisi, semprotkan air ke dalam nyala, atur galvanometer sampai angka nol, semprotkan larutan standar yang paling pekat ke dalam nyala dan atur kepekaan sedemikian sampai galvanometer menunjukkan penyimpangan skala penuh; semprotkan air lagi ke dalam nyala, atur kembali sampai galvanometer menunjukkan angka nol.

Untuk pengukuran serapan, semprotkan air ke dalam nyala, atur sampai galvanometer menunjukkan penyimpangan penuh pada instrumen yang telah ditera terhadap transmisi; untuk instrumen tipe ini tidak perlu dilakukan pengaturan selanjutnya. Untuk instrumen yang ditera terhadap serapan gunakan petunjuk pabrik. Semprotkan masing-masing larutan standar tiga kali ke dalam nyala, catat galvanometer yang telah mantap dan cuci dengan air setiap kali setelah penyemprotan. Buat kurva kalibrasi dengan menggambarkan rata-rata pembacaan masing-masing larutan standar terhadap kadar. Buat larutan uji seperti tertera pada monografi dan atur kadar, jika perlu sedemikian rupa sesampai dalam batas kadar yang sesuai dengan alat yang digunakan, semprot larutan ke dalam nyala, catat penyimpangan galvanometer dan cuci alat dengan air setiap kali setelah penyemprotan. Dengan menggunakan rata-rata pembacaan tetapkan kadar unsur dari kurva kalibrasi. Ulangi pengujian menggunakan larutan standar dan larutan uji dengan kadar yang sama untuk meyakinkan hasil pengukuran.

Prosedur II

Ke dalam masing-masing tidak kurang dari 3 labu terukur kapasitas sama, masukkan volume sama larutan yang dibuat menurut cara yang tertera pada masing-masing monografi. Kecuali ke dalam 1 labu, tambahkan pada masing-masing labu sejumlah larutan standar yang diukur saksama, sampai diperoleh seri larutan dengan kadar teratur menaik. Pada semua labu masing-masing tambahkan air secukupnya sampai volume labu. Atur instrumen menurut cara yang tertera pada prosedur I. Amati masing-masing larutan 3 kali, gambarkan kurva yang menyatakan hubungan antara harga rata-rata pembacaan terhadap kadar; titik potong antara sumbu pada kertas grafik menunjukkan pembacaan nol pada galvanometer dan kadar larutan tidak mengalami penambahan. Tarik garis lurus yang menghubungkan titik pada grafik sampai mernotong perpanjangan sumbu kadar. Jarak titik ini dan titik potong sumbu menyatakan kadar unsur yang terdapat dalam larutan uji.

Kejernihan dan Tingkat Opalesensi Cairan tak Berwarna

Kejernihan dan Opalesensi

Peralatan

Gunakan tabung Nessler seperti yang tertera pada uji batas logam berat.

Pereaksi

Larutan natrium klorida 0,2 M. Larutkan 11,69 g natrium klorida, encerkan sampai batas volume 1000,0 ml

Larutan klorida I. Encerkan 1,0 ml larutan natrium klorida 0,2 M dengan air sampai batas volume 100,0 ml; setiap ml setara 70,91 µg Cl.

Larutan klorida II. Encerkan 20,0 ml larutan klorida I dengan air sampai batas volume 100,0 ml; setiap ml setara 14,182 µg Cl.

Larutan klorida III. Encerkan 1,0 ml larutan klorida II dengan air sampai batas volume 100,0 ml, setiap ml setara dengan 0,7091 µg Cl.

Larutan standar buat segar larutan standar seperti tertera pada daftar.

	A (ml)	B (ml)	C (ml)	D (ml)
Larutan klorida III	0,25	3,75	–	–
Larutan klorida II	–	–	0,75	1,25
Larutan asam nitrat 12,6% b/v	5,0	5,0	5,0	5,0
Air	3,75	0,25	3,25	2,75
Larutan perak nitrat 1,7% b/v	1,0	1,0	1,0	1,0

Prosedur

Masukkan masing-masing 10,0 ml larutan uji dan 10,0 ml larutan standar ke dalam tabung Nessler, biarkan selama 5 menit, bandingkan.

Pernyataan cairan dikatakan jernih, jika kejernihannya sama dengan air atau pelarut yang digunakan.

- Cairan dikatakan tidak opalesen jika opalesensinya tidak lebih kuat dari larutan A
- Cairan dikatakan opalesen lemah jika opalesensinya lebih kuat dari larutan A tetapi tidak lebih kuat dari B.
- Cairan dikatakan opalesen jika opalesensinya lebih kuat dari B tetapi tidak lebih kuat dari C.
- Cairan dikatakan opalesen kuat jika opalesensinya lebih kuat dari C tetapi tidak lebih kuat dari D

Tingkat Warna Cairan

Pemeriksaan tingkat warna cairan berikut ini dimaksudkan untuk cairan berwarna coklat, kuning dan merah. Kecuali dinyatakan lain pemeriksaan dilakukan menurut prosedur I.

Cairan dinyatakan tidak berwarna jika warna cairan tampak seperti air.

Peralatan

Untuk prosedur I. Digunakan tabung standar warna diameter 12 mm, terbuat dari kaca netral dan transparan.

Untuk prosedur II. Digunakan tabung standar warna diameter 16 mm, terbuat dari kaca netral dan transparan.

Pereaksi

Larutan primer kuning. Larutkan dan encerkan 46,0 g besi (III) klorida dalam campuran 25 ml asam hidroklorida dan 975 ml air sampai batas volume 1000,0 ml. Encerkan kembali dengan campuran yang sama sampai diperoleh konsentrasi 45,0 mg/ml ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) yang ditetapkan sebagai berikut: Masukkan ke dalam labu 200 ml bersumbat kaca 10,0 ml larutan, 15 ml air, 5 ml asam hidroklorida dan 4 g kalium iodida, tutup, biarkan di tempat gelap selama 15 menit. Tambah 100 ml air, titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M menggunakan indikator 10 tetes larutan kanji. Setiap ml natrium tiosulfat 0,1 M setara 27,03 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Larutan primer merah. Larutkan dan encerkan 60,0 g kobalt klorida dalam lebih kurang 900 ml campuran 25 ml asam hidroklorida dan 975 ml air sampai batas volume 1000,0 ml. Encerkan kembali sampai diperoleh konsentrasi 59,5 mg/ml ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) yang ditetapkan sebagai berikut: Masukkan ke dalam labu bersumbat kaca 5,0 ml larutan, 5 ml hidrogen peroksida encer dan 10 ml larutan natrium hidroksida 30% b/v. Dididihkan hati-hati selama 10 menit, biarkan dingin. Tambah 60 ml asam sulfat encer dan 2 g kalium iodida, tutup, larutkan endapan dengan pengocokan hati-hati. Titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 N menggunakan indikator 10 tetes larutan kanji sampai warna merah jambu. Setiap ml natrium tiosulfat 0,1 M setara dengan 23,79 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Larutan primer biru. Larutkan dan encerkan 63 g tembaga (II) sulfat dalam lebih kurang 900 ml campuran 25 ml asam hidroklorida dan 975 ml air sampai batas volume 1000,0 ml. Encerkan kembali sampai diperoleh konsentrasi 62,4 mg/ml ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) yang ditetapkan sebagai berikut: Pada 10,0 ml larutan, tambah 50 ml air, 12 ml asam asetat encer dan 3 g kalium iodida. Titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M menggunakan indikator kanji sampai warna coklat agak pucat. Setiap ml natrium tiosulfat 0,1 M setara 24,97 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Larutan standar. Buat lima larutan standar menggunakan 3 larutan primer berikut:

Larutan baku	Larutan primer			HCl 1% b/v (ml)
	Kuning (ml)	Merah (ml)	Biru (ml)	
C (coklat)	3,0	3,0	2A	1,6
KC (kuning kecoklatan)	2A	1'0	0A	6,2
K (kuning)	2,4	0,6	0'	7,0
KH (kuning kehijauan)	9,6	0,2	0,2	0
M (merah)	0	2,0	0	7,0

Larutan standar untuk prosedur I Buat larutan g seperti yang tertera pada daftar berikut, menggunakan 5 larutan standar:

Larutan standar C		
Larutan standar	Larutan standar C (ml)	HCl 1% b/v (ml)
C1	1,50	0,50
C2	1,00	1,00
C3	0,75	1,25
C4	0,50	1,50
C5	0,25	1,75
C6,	0,10	1,90

Larutan standar KC		
Larutan standar	Larutan standar KC (ml)	HCl 1% b/v (ml)
KCI	2,00	0,00
KC2	1,50	0,50
KC3	0,75	1,25
KC4	0,50	1,50
KC5	0,25	1,75
KC6	0,10	1,90

Larutan standar K		
Larutan standar	Larutan standar K (ml)	HCl 1% b/v (ml)
K1	2,00	0,00
K 2	1,50	0,50
K 3	1,00	1,00
K 4	0,50	1,50
K 5	0,25	1,75
K6	0,10	1,90

Larutan standar KH		
Larutan standar	Larutan standar KH (ml)	HCl 1% b/v (ml)
KH1	0,50	1,50
KH 2	0,30	1,70
KH3	0,17	1,83
KH 4	0,10	1,90
KH 5	0,06	1,94
KH6	0,03	1,97

Larutan standar M		
Larutan standar	Larutan standar M (ml)	HCl 1% b/v (ml)
M1	2,00	0,00
M 2	1,50	0,50
M 3	1,00	1,00
M4	0,75	1,25
M 5	0,50	1,50
M 6	0,25	1,75

Penyiapan. Simpan larutan dalam tabung tidak berwarna tertutup, diameter dalam 12 ml, terlindung dari cahaya.

Larutan standar untuk prosedur II. Gunakan 10 ml larutan standar seperti yang tertera pada prosedur I.

Prosedur I

Bandingkan warna 2,0 ml cairan uji terhadap warna 2,0 ml air atau larutan standar g seperti tertera pada monografi. Bandingkan warna dalam cahaya baur dengan arah horisontal terhadap latar belakang putih.

Prosedur II

Bandingkan warna 10,0 ml uji terhadap warna 10,0 ml air atau larutan pembanding seperti tertera pada monografi. Amati kolom cairan ke bawah sumbu vertikal tabung dalam cahaya baur terhadap latar belakang putih

Kromatografi

Kromatografi yang diuraikan berikut adalah cara pemisahan zat khasiat dan zat lain yang ada dalam sediaan dengan jalan penyarian berfraksi, penyerapan, atau penukaran ion pada zat berpori, menggunakan cairan atau gas yang mengalir. Zat yang diperoleh dapat digunakan untuk uji identifikasi atau penetapan kadar. Kromatografi yang sering digunakan adalah kromatografi kolom, kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi gas. Sebagai zat penyerap selain kertas, digunakan juga zat penyerap berpori misalnya aluminium oksida yang diaktifkan, asam silikat atau silika gel, kieselgur dan harsa sintetik. Zat tersebut dapat digunakan sebagai penyerap tunggal atau campuran atau sebagai penyangga zat lain. Kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis umumnya lebih berguna untuk uji identifikasi karena cara ini khas dan mudah dilakukan untuk zat dengan jumlah sedikit. Kromatografi gas memerlukan alat yang lebih rumit, tetapi cara tersebut sangat berguna untuk uji identifikasi dan penetapan kadar.

Kromatografi Jerap

Zat penjerap (misalnya aluminium oksida yang telah diaktifkan, silika gel, kieselgur terkalsinas, dan kieselgur kromatografi murni) dalam keadaan kering atau sebagai bubuk, dimampatkan ke dalam tabung kaca atau tabung kuwarsa dengan ukuran tertentu dan mempunyai lubang pengalir ke luar dengan ukuran tertentu. Sediaan yang diuji yang dilarutkan dalam sedikit pelarut ditambahkan pada puncak kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam zat penjerap, zat khasiat diserap dari larutan secara sempurna oleh bahan penjerap berupa pita sempit pada puncak kolom. Dengan mengalirkan pelarut lebih lanjut, dengan atau tanpa tekanan udara, masing-masing zat bergerak turun dengan kecepatan khas sampai terjadi pemisahan dalam kolom yang disebut kromatogram. Kecepatan bergerak zat dipengaruhi beberapa faktor

misalnya daya serap zat penjerap, sifat pelarut dan suhu dari sistem kromatografi. Jika yang terpisah berwarna atau berfluoresensi dengan sinar ultra violet, kolom penjerap dapat dikeluarkan dan dengan cara memotong melintang, lapisan yang diperlukan dapat dipisahkan. Zat disari dari tiap lapisan dengan pelarut yang sesuai. Jika zat yang terpisah tidak berwarna, letak lapisan zat dapat diketahui dengan cara memberi warna atau menyemprot kolom yang telah dikeluarkan dengan pereaksi yang dapat membentuk warna. Zat radioaktif dapat diketahui tempatnya dengan menggunakan pencacah Geiger Muller atau alat yang sejenis. Pemisahan lebih banyak dilakukan adalah pemisahan dengan mengalirkan pelarut melalui kolom sesampai zat berkhasiat yang dikehendaki ke luar dalam eluat. Cara ini disebut kromatografi mengalir. Kadar zat di dalam eluat dapat ditetapkan dengan cara titrasi, spektrofotometri atau pelarut dapat diuapkan sampai diperoleh zat dalam keadaan hampir murni. Jika dikehendaki, pemisahan beberapa zat khasiat dapat dilakukan dengan mengalirkan selanjutnya pelarut yang sama atau pelarut lain yang mempunyai daya elusi yang lebih kuat. Kadang kadang digunakan modifikasi cara di atas yaitu dengan menambahkan campuran pada kolom. Sediaan dalam bentuk padat misalnya, serbuk tablet, tanpa pemisahan dari bahan tambahan dicampur dengan sebagian zat penjerap dan ditambahkan pada puncak kolom. Aliran pelarut menggerakkan zat berkhasiat turun pada kolom dengan cara seperti yang telah diterangkan di atas.

Kromatografi Pembagian

Pada kromatografi pembagian, zat yang harus dipisahkan terbagi antara dua cairan yang tidak dapat bercampur. Salah satu cairan, yaitu fase diam biasanya diserap oleh zat penjerap padat, karena itu memberikan daerah permukaan yang sangat luas kepada pelarut yang mengalir atau fase bergerak, dan menghasilkan pemisahan yang baik, tidak dapat dicapai dengan cara penyarian cairan-cairan yang biasa. Kromatografi pembagian dilakukan dengan cara mirip dengan kromatografi penjerapan, yaitu campuran yang telah dilarutkan dalam sedikit pelarut, ditambahkan pada puncak kolom dan elusi dilakukan dengan pelarut yang mengalir. Umumnya sebelum digunakan, fase bergerak dijenuhkan dahulu dengan fase diam. Dalam hal tertentu lebih baik zat yang diuji yang telah dilarutkan dalam fase diam ditambahkan pada sedikit zat penyerap, kemudian campuran ini dipindahkan pada puncak kolom.

Kromatografi Kertas

Pada kromatografi kertas sebagai penjerap digunakan sehelai kertas dengan susunan serabut dan tebal yang sesuai. Pemisahan dapat dilakukan menggunakan pelarut tunggal dengan proses yang analog dengan kromatografi penjerapan atau menggunakan dua pelarut yang tidak dapat bercampur dengan proses yang analog dengan kromatografi pembagian. Pada kromatografi pembagian, fase bergerak merambat

perlahan-lahan melalui fase diam yang membungkus serabut kertas atau yang membentuk kompleks dengan serabut kertas. Perbandingan jarak perambatan suatu zat dengan jarak perambatan fase bergerak dihitung dari titik penotolan larutan zat, dinyatakan sebagai R_f zat tersebut. Perbandingan jarak perambatan suatu zat dengan jarak perambatan standar kimia dinyatakan sebagai R_f

Penggunaan zat standar pada uji identifikasi

Harga R_f , mutlak sukar ditetapkan, karena harga R_f yang diperoleh tergantung dari kondisi pengujian. Harga R_f tersebut sangat berguna untuk identifikasi pendahuluan senyawa kimia. Identifikasi pemastian dilakukan dengan menggunakan zat standar kimia. Dalam hal ini dibuat 3 kromatogram pada sehelai kertas; pertama dari zat yang diuji, kedua dari zat standar kimia dan ketiga dari campuran zat yang diuji dengan zat standar kimia dengan jumlah yang lebih kurang sama. Untuk masing-masing kromatogram digunakan sejumlah zat yang bobotnya lebih kurang sama. Jika zat yang diuji sama dengan zat standar kimia, maka ketiga kromatogram memberikan warna dan mempunyai harga R_f , yang sama, dengan kromatogram campuran memberikan bercak tunggal ($R_f = 1,0$). Untuk uji identifikasi perlu dilakukan dengan paling sedikit dua pelarut yang berbeda.

Letak bercak

Letak bercak yang diperoleh dari zat yang dikromatografi dapat ditetapkan dengan cara berikut:

1. Pengamatan langsung, jika zat tampak dengan cahaya biasa atau dengan sinar ultraviolet.
2. Pengamatan dengan cahaya biasa atau dengan sinar ultraviolet setelah kertas disemprot dengan pereaksi yang dapat membuat bercak tersebut tampak.
3. Menggunakan pencacah Geiger Muller atau teknik otoradiografi, jika ada zat radioaktif.
4. Menempatkan pita atau potongan kertas pada medium pembiakan yang telah ditanami, untuk melihat hasil stimulasi atau hambatan dari pertumbuhan bakteri.

Kromatografi Kertas Menurun

Pemisahan zat dengan cara kromatografi kertas menurun dilakukan dengan membiarkan fase bergerak merambat turun pada kertas kromatografi.

Peralatan

Bejana kromatografi. Bejana tertutup kedap, yang mempunyai lubang untuk penambalan pelarut atau untuk pengurangan tekanan dalam. Bejana sebaiknya dari kaca, baja tahan karat atau porselen dan dibuat sampai dapat dilakukan pengamatan selama kromatografi tanpa membuka bejana. Silinder kaca yang tinggi dapat digunakan jika dibuat kedap dengan tutup yang sesuai.

Rak tahanan korosi. Tinggi rak 5 cm kurang dari tinggi bejana bagian dalam rak digunakan sebagai penyangga bak pelarut dan batang kaca antisifon.

Bak pelarut. Satu atau lebih bak pelarut terbuat dari kaca yang dapat memuat pelarut lebih besar dari yang diperlukan untuk satu kali pemisah. Panjang bak pelarut harus lebih besar dari lebar kertas kromatografi.

Batang kaca antisifon. Batang kaca antisifon disangga oleh rak, letaknya di luar sejajar dengan tepi bak pelarut dan sedikit lebih tinggi. Batang tersebut digunakan sebagai penahan kertas kromatografi.

Kertas kromatografi. Digunakan kertas filter khusus yang panjangnya kira-kira sama dengan tinggi bejana. Lebar kertas tidak kurang dari 2,5 cm tetapi tidak lebih lebar dari panjang bak pelarut. Buat garis tipis dengan pensil melintang pada kertas dengan jarak tertentu dari salah satu ujung kertas, sampai jika kertas digantung pada batang kaca antisifon dengan ujung atas di dalam bak pelarut dan ujung lain tergantung bebas, garis tersebut terletak beberapa cm di bawah batang kaca antisifon. Usahakan agar kertas tidak terkena kotoran.

Prosedur

Prosedur I

Zat yang diuji dilarutkan dalam pelarut yang sesuai. Sejumlah volume larutan zat yang umumnya mengandung 1–20 μg , ditotolkan pada titik-titik tertentu pada garis pensil, diameter bercak 6 mm sampai 10 mm dengan jarak tidak kurang dari 3 cm. Jika jumlah larutan yang ditotolkan akan menghasilkan bercak dengan diameter lebih dari 10 mm, totolkan larutan sedikit demi sedikit pada titik yang sama, tiap kali biarkan mengering dahulu sebelum ditotolkan lagi. Kertas tersebut digantung dalam bejana dengan menggunakan batang kaca antisifon dan batang kaca tebal lain yang dapat menahan ujung atas kertas di dalam bak pelarut. Dasar bejana digenangi dengan kedua fase dengan ditetapkan dalam sistem pelarut. Bagian kertas yang tergantung di bawah batang kaca antisifon harus tergantung bebas di dalam bejana tanpa menyinggung rak, dinding bejana atau cairan yang terdapat dalam dasar bejana. Bejana ditutup sesempai terjadi keseimbangan (kejenuhan) dari bejana dan kertas. Jika perlu tekanan dalam yang berlebihan dikurangi. Agar tercapai keseimbangan untuk bejana yang berukuran besar perlu dilakukan selama 1 malam. Keseimbangan dapat dipercepat dengan cara melapis dinding bagian dalam bejana dengan kertas filter, sampai pelarut menguap dari daerah yang luas dan diberikan oleh kertas. Sejumlah fase bergerak dengan volume berlebihan yang diperlukan untuk kromatografi dijenuhkan dengan fase diam dengan cara pengocokan. Setelah penjenuhan bejana, fase bergerak dimasukkan ke dalam bak pelarut melalui lubang. Lubang ditutup dan fase bergerak dibiarkan merambat turun pada kertas sejauh yang dikehendaki. Pada waktu membuka tutup bejana dan mengangkat kertas, usahakan agar pelarut tidak merambat lagi. Batas perambatan pelarut segera ditandai dan kertas dikeringkan. Kromatogram diamati dan diukur langsung atau setelah disemprot dengan pereaksi yang sesuai.

Prosedur II

Lakukan menurut cara yang tertera pada prosedur I

tetapi bejana dijenuhkan dengan fase gerak dan kertas telah dicelupkan dalam fase diam.

Kromatografi Kertas Menaik

Pada kromatografi kertas menaik, ujung bawah kertas dicelupkan ke dalam fase bergerak sampai fase bergerak merambat naik pada kertas.

Peralatan

Alat yang digunakan sama dengan alat yang digunakan pada kromatografi kertas menurun.

Prosedur

Larutan zat yang diperiksa ditotolkan pada kertas dengan cara seperti yang tertera pada kromatografi kertas menurun. Sejumlah volume campuran pelarut dari kedua fase dituangkan ke dalam bejana. Bejana pelarut kosong ditempatkan pada dasar bejana dan kertas digantung sesampai bagian ujung kertas yang telah ditotol dengan larutan yang di uji, tergantung bebas di dalam bak pelarut kosong. Bak ditutup, dan dijenuhkan menurut cara yang tertera pada kromatografi kertas menurun. Kemudian pelarut dengan jumlah berlebihan dari yang diperlukan untuk membasahi kertas seluruhnya dituangkan ke dalam bak pelarut melalui lubang. Bejana kemudian ditutup lagi. Jika batas perambatan pelarut telah mencapai ketinggian yang dikehendaki, bejana dibuka, kertas dikeluarkan, batas perambatan pelarut segera ditandai dan kertas dikeringkan. Silinder kaca kecil dapat digunakan tanpa bak pelarut, sampai hanya fase bergerak yang terdapat pada dasar bejana. Pada waktu penjenuhan, kertas tergantung dengan ujung bawah tepat di atas pelarut dan kromatografi dimulai dengan menurunkan kertas sampai tercelup dalam pelarut.

Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis digunakan untuk pemisahan senyawa secara cepat, dengan menggunakan zat penjerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca. Lempeng yang dilapis, dapat dianggap sebagai "kolom kromatografi terbuka" dan pemisahan dapat didasarkan pada penjerapan, pembagian atau gabungannya, tergantung dari jenis zat penjerap dan cara pembuatan lapisan zat penjerap dan jenis pelarut.

Kromatografi lapis tipis pada penjerap penukar ion dapat digunakan untuk pemisahan senyawa polar. Harga R_f , yang diperoleh pada kromatografi lapis tipis tidak tetap, jika dibandingkan dengan yang diperoleh pada kromatografi kertas. Karena itu pada lempeng yang sama disamping kromatogram zat yang diuji perlu dibuat kromatogram zat standar, lebih baik dengan kadar yang berbeda-beda. Perkiraan identifikasi diperoleh dengan pengamatan 2 bercak dengan harga R_f , dan ukuran yang hampir sama. Perbandingan ukuran bercak secara visual atau densitometri dapat digunakan untuk memperkirakan kadar. Penetapan kadar yang lebih teliti dapat dilakukan dengan cara mengambil bercak dengan hati-hati dari lempeng,

kemudian disari dengan pelarut yang sesuai dan diukur dengan cara spektrofotometri.

Pada kromatografi lapis tipis dua dimensi, lempeng yang telah dieluasi diputar 90°C dan dieluasi lagi, umumnya menggunakan bejana lain yang dijenuhkan dengan sistem pelarut yang berbeda.

Peralatan

Lempeng. Yang tersedia secara komersial sesuai dengan peruntukannya sebagaimana dinyatakan dalam monografi.

Bejana kromatografi. Bejana kromatografi umumnya dapat memuat 2 lempeng kaca dan dapat tertutup rapat. Ke dalam bejana dapat dimasukkan sebuah rak penyangga terbuat dari baja tahan karat yang dapat memuat 2 lempeng kaca adalah menyebelah. Bagian atas bejana terasah halus dan rata dan dapat ditutup rapat dengan tutup kaca dengan pertolongan lemak penutup.

Sablon. Sablon umumnya dibuat dari plastik, digunakan untuk membantu memberi tanda pada lempeng, misalnya untuk memberi tanda pada tempat penotolan dengan jarak tertentu dan untuk membantu memberi tanda lain pada lempeng.

Pipet mikro. Pipet mikro berskala $10\ \mu\text{l}$ untuk memindahkan cairan. Jumlah larutan zat diperiksa dan larutan standar yang harus ditotolkan, tertera pada masing-masing monografi.

Alat penyemprot pereaksi. Alat penyemprot tahan terhadap pereaksi dan dapat menyemprotkan pereaksi dalam bentuk butir-butir halus.

Pelarut. Larutan standar, larutan zat yang diperiksa dan pereaksi tertera pada masing-masing monografi.

Lampu ultraviolet. Lampu ultraviolet yang sesuai untuk pengamatan dengan panjang gelombang pendek ($254\ \text{nm}$) dan dengan panjang gelombang panjang ($336\ \text{nm}$).

Prosedur

Bersihkan lempeng kaca dengan cara mencelup ke dalam asam pencuci, bilas dengan air secukupnya sampai air mengalir dari lempeng kaca tanpa meninggalkan bercak air atau minyak, keringkan dengan lap bersih. Pada waktu melapiskan zat penjerap, lempeng harus bebas dari serat atau debu. Atur lempeng kaca di atas baki lempeng, letakkan lempeng tepi berukuran $5\ \text{cm} \times 20\ \text{cm}$ pada ujung dan pangkal baki dan usahakan agar pada waktu melapisi semua lempeng tidak ada yang tergeser. Letakkan alat pembuat lapisan pada ujung baki. Kecuali dinyatakan lain, campur 1 bagian zat penjerap dengan 2 bagian volume air, kocok kuat dalam labu kimia bersumbat kaca selama 30 detik. Tuangkan bubur tersebut ke dalam alat pembuat lapisan. Umumnya $30\ \text{g}$ zat penjerap dan $60\ \text{ml}$ air cukup untuk 5 lempeng berukuran $20\ \text{cm} \times 20\ \text{cm}$. Pekerjaan melapisi ini harus selesai dalam waktu 2 menit sejak penambahan air, karena setelah 2 menit campuran yang menggunakan perekat mulai menjadi keras. Geser hati-hati alat pembuat lapisan di atas

lempeng kaca ke arah sisi pendek baki yang berbingkai. Jika telah sampai pada lempeng tepi terakhir, angkat alat pembuat lapisan. Bilas segera alat pembuat lapisan. Biarkan lempeng selama 5 menit kemudian pindahkan lempeng pada rak penyimpanan dengan lapisan menghadap ke atas, keringkan pada suhu 105°C selama 30 menit. Setelah lempeng kering, biarkan dingin pada suhu kamar dan amati kesebaran pembagian dan cahaya yang dipantulkan akan menunjukkan kesebaran susunan. Simpan lempeng dalam desikator yang sesuai.

Kecuali dinyatakan lain pada masing-masing monografi, tempatkan pada 2 sisi bejana kromatografi, 2 helai kertas saring, tinggi 18 cm, lebar sama dengan panjang bejana. Masukkan 100 ml pelarut ke dalam bejana kromatografi sampai tinggi pelarut 0,5–1 cm, sumbat rapat, biarkan sistem mencapai keseimbangan, kertas saring harus basah seluruhnya. Seluruh sisi bejana dapat juga dilapisi dengan kertas saring. Pada dasar bejana kertas saring harus tercelup ke dalam pelarut. Totolkan larutan zat yang diperiksa dan larutan standar, menurut cara yang tertera pada masing-masing monograf dengan jarak kira-kira 1,5 cm dan kira-kira 2 cm dari tepi bawah lempeng, biarkan kering. Tepi bawah lempeng adalah bagian lempeng yang terdahulu didahului oleh alat pembuat lapisan pada waktu melapiskan zat penjerap. Sablon menentukan titik tempat penotolan dan jarak yang harus dilalui pelarut. Tempatkan lempeng pada rak penyangga, sampai tempat penetasan terletak di sebelah bawah, masukkan rak penyangga ke dalam bejana. Pelarut yang ada di dalam bejana harus mencapai tepi bawah lapisan penjerap, tempat penetasan tidak boleh terendam. Sumbat rapat dengan pertolongan lemak penutup, biarkan sampai pelarut merambat 10–15 cm di atas titik penotolan. Umumnya berlangsung selama kira-kira 15 menit sampai 1 jam; keluarkan lempeng. Keringkan di udara, amati bercak mula-mula dengan sinar ultraviolet gelombang pendek (254 nm) kemudian dengan sinar ultraviolet gelombang panjang (366 nm). Ukur dan catat jarak bercak dari titik penotolan, dan catat panjang gelombang untuk tiap bercak yang tampak. Jika perlu, semprot bercak dengan pereaksi yang tertera pada monografi, amati dan bandingkan kromatogram zat yang diperiksa dengan kromatogram zat standar. Hitung nilai R_f seperti pada kromatografi kertas.

Kromatografi Gas

Kromatografi gas dapat dianggap sebagai suatu bentuk kromatografi kolom di mana fase gerak adalah gas yang disebut gas pembawa. Fase diam dapat berupa zat penjerap aktif misalnya alumina, silika gel atau karbon (kromatografi gas padat) atau dapat berupa cairan yang dilapiskan sebagai lapisan tipis pada zat pada penyangga inert yang halus, misalnya kiselgur, serbuk bata, butir gelas atau bahan lain yang sesuai (kromatografi gas cair). Jika diameter kolom kromatografi sangat kecil, fase diam dilapiskan pada dinding dalam sampai diperoleh kolom tabung terbuka atau kolom kapiler. Bahan tertentu tidak memerlukan pelapisan dengan fase cair, misalnya butiran poliaromatik berpori, dan

ini sangat berguna untuk penggunaan yang khusus. Zat yang diuji dimasukkan ke dalam aliran gas pembawa pada pangkal kolom dalam bentuk uap dan mengalami proses pembagian antara fase gas dari fase diam dengan cara yang serupa dengan bentuk kromatografi lainnya.

Koefisien pembagian (K) dinyatakan sebagai berikut:

$$K = \frac{\text{Jumlah zat dalam fase diam}}{\text{Jumlah zat dalam fase bergerak}}$$

K tergantung dari sifat zat, sifat dan jumlah fase diam, suhu dan kecepatan alir gas pembawa. Harga K tergantung dari kolom tertentu dan kondisi pengujian yang tepat, dan karena kondisi ini tidak mungkin diulangi secara tepat dalam laboratorium yang berlainan dan dengan alat yang berlainan, maka kondisi percobaan tersebut perlu ditetapkan secara fleksibel, berbeda dari cara pengujian yang bukan cara kromatografi. Bagian yang penting dari alat kromatografi gas cair (yang lebih banyak digunakan dari kromatografi gas padat) terdiri dari sumber gas pembawa (biasanya dalam bentuk gas tekan dalam silinder yang dilengkapi dengan katup pengurang tekanan), pengukur kecepatan alir yang dilewati gas pembawa, dan injektor yang dapat dipanaskan sampai suhu yang sesuai untuk menguapkan tetapi tidak menguraikan zat. Larutan zat yang diperiksa dimasukkan melalui injektor ke dalam aliran gas pembawa, sebaiknya langsung dimasukkan ke dalam kolom. Selama proses kromatografi berlangsung kecepatan alir gas pembawa dipertahankan tetap. Komponen dari larutan zat yang diperiksa terpisah menurut nilai K masing-masing komponen pada kondisi tertentu yang digunakan. Setelah keluar dari kolom, komponen tersebut masuk ke detektor jenis diferensial, yang sesuai, biasanya tergantung dari perubahan ionisasi dalam nyala atau perubahan daya hantar panas. Detektor jenis lain berguna untuk penggunaan khusus, misalnya detektor penangkap elektron yang sangat berguna untuk mendeteksi dengan peka senyawa halogen. Sinyal listrik dari detektor dilakukan ke amplifier yang dihubungkan dengan alat pencatat, misalnya alat pencatat kertas grafik yang mencatat sinyal terhadap waktu. Alat yang sangat kuat untuk mendeteksi adalah spektrometer massa yang dihubungkan dengan alat kromatografi gas. Alat ini sangat peka dan memberikan keterangan yang dapat memberi hasil identifikasi secara pasti zat yang keluar dari kolom. Kolom biasanya dibuat dari kaca (atau kadang-kadang dari logam, walaupun harus hati-hati karena zat organik tertentu mengalami reaksi penguraian karena katalisasi logam pada suhu yang dinaikkan) dan ditempatkan dalam ruang pemanas yang suhunya dapat diatur dan dipertahankan pada suhu yang berkisar sedikit di atas suhu kamar seperti lebih kurang 300°C menurut keperluannya. Ruang pemanas dapat juga diatur sampai kenaikan suhu yang tetap dalam waktu yang ditentukan dapat dipertahankan. "Program suhu" tersebut berguna untuk pemeriksaan campuran kompleks dari senyawa yang mempunyai sifat penguapan yang sangat berbeda. Biasanya digunakan kolom dengan ukuran panjang

yang bermacam-macam, yaitu dari 0,5—3 m untuk kolom terisi dan 10—100 m untuk kolom kapiler. Kolom yang banyak digunakan berukuran panjang lebih dari 1,5 m dan diameter dalam 2 mm sampai 5 mm. Bahan pengisi yang terdapat dalam kolom untuk kromatografi gas cair sangat mempengaruhi mutu dan efektifitas pemisahan. Zat padat penyangga, dengan bermacam macam ukuran partikel antara 24—80 (meskipun untuk tiap kolom ukuran partikel harus serba sama) harus inert, terutama bila yang diperiksa zat polar menggunakan zat padat penyangga yang dilapis dengan kadar rendah zat cair berpolaritas rendah. Bagian yang aktif pada zat padat penyangga dapat mengakibatkan kurva berekor dari zat, atau bahkan peruraian atau perubahan susunan. Reaktivitas zat padat penyangga dapat dikurangi dengan mereaksikan dengan pereaksi silanisasi sebelum dilapis dengan fase diam. Residu zat yang disuntikkan dapat menyebabkan bagian pangkal kolom menjadi tidak efektif. Fase cair yang biasa digunakan termasuk polietilenglikol dan esternya, amida berbobot molekul tinggi, gum silikon, cairan silikon dan hidrokarbon. Gum silikon adalah senyawa polisiloksan yang disubsitusikan dan merupakan golongan fase diam yang sangat penting. Suhu tertinggi yang akan digunakan untuk suatu fase diam harus diperhatikan dengan teliti karena bila digunakan suhu secara berlebihan dapat terjadi kerusakan kolom yang dapat memberikan hasil yang meragukan. Sebelum digunakan, pada kolom baru harus dialirkan gas pembawa selama beberapa jam pada suhu sedikit di atas suhu yang akan digunakan, tetapi tidak melebihi suhu tertinggi yang dianjurkan.

Sebagai gas pembawa perlu dipilih gas yang inert, dan untuk detektor ionisasi nyala, nitrogen sangat memuaskan. Helium juga sesuai digunakan, biasanya dipilih untuk detektor konduktivitas panas karena mempunyai daya hantar panas yang tinggi. Helium tidak mudah diperoleh dan harganya mahal, sedangkan nitrogen dapat diperoleh dengan mudah. Untuk pengujian kuantitatif dengan kromatografi gas-cair biasanya digunakan standar internal karena perbandingan satu kromatogram dengan kromatogram lain yang dihasilkan oleh kedua injek dapat menyebabkan terjadinya kesalahan. Penambahan standar internal yang sesuai pada larutan zat yang diperiksa dan pada larutan standar menghilangkan kesalahan tersebut, karena perbandingan luas kurva atau tinggi kurva dari zat yang ditetapkan dan dari standar internal diperbandingkan dari satu kromatogram ke kromatogram lainnya. Pada penggunaan yang lain mungkin lebih sesuai digunakan proses normalisasi, terutama untuk penetapan cemaran. Dalam hal ini luas kurva dari cemaran yang akan ditetapkan dinyatakan sebagai kadar dalam % jumlah luas semua kurva dari zat yang diperiksa dan cemarannya. Karena kurva komponen utama biasanya paling kurang akan mempunyai pembesaran 2 tingkat lebih besar dari kurva cemaran yang lebih kecil, maka untuk penetapan ini perlu menggunakan integrator otomatis yang dapat dipercaya dan amplifier berjarak besar yang akan memberikan respon yang linier untuk komponen yang jumlahnya besar dan kecil. Luas kurva

ditetapkan dengan grafik. Pada keadaan tertentu dapat dibenarkan untuk menggunakan pengukuran tinggi kurva dari pada luas kurva, meskipun pengukuran luas kurva dianggap lebih teliti untuk penetapan kuantitatif. Jika pengukuran lebar kurva diperlukan, lebar kurva tersebut didefinisikan sebagai jarak antara dua titik persilangan pada garis dasar dengan garis singgung kurva. Jika menggunakan standar internal, cara berikut dapat diterapkan. Sediakan 3 macam larutan yaitu:

Larutan (I). Mengandung standar internal sejumlah yang sesuai dari zat standar yang sesuai dengan zat akan ditetapkan (pada penetapan cemaran, dapat digunakan cemaran itu sendiri, jika ada atau zat standar dengan kadar rendah yang mengandung cemaran tersebut). Kromatogram A yang diperoleh dapat menggambarkan hubungan antara respon standar internal dan zat uji.

Larutan (II). Mengandung zat uji; hal ini untuk dapat memastikan bahwa tidak ada cemaran yang akan keluar dengan waktu tambat yang sama dengan standar internal, atau jika ada kurva yang berhimpitan maka cemaran yang ada harus diperhitungkan.

Larutan (III). Mengandung zat uji dan standar internal (kadar standar internal sama dengan kadar pada larutan (I)). Data yang didapat dari kromatogram A dan C, jika perlu dikoreksi dengan data yang diperoleh dari kromatogram B, memungkinkan dapat ditetapkannya kadar kecil komponen yang ada dalam zat uji.

Jika digunakan cara normalisasi, cukup gunakan satu larutan saja, karena jumlah luas semua kurva kecil akan dinyatakan sebagai bagian dari jumlah luas kurva. Jika kurva kecil khusus akan ditentukan, diperlukan larutan kedua yang mengandung zat uji agar dapat identifikasi kurva yang sesuai pada kromatogram dari zat yang diperiksa.

Prosedur penetapan

Panjang kolom kromatografi, fase diam, suhu, gas pembawa, detektor, dan lain lain hal yang berhubungan dan diperlukan pada penetapan disebutkan dalam masing-masing monografi. Jika akan menginjek zat yang tidak menguap ke dalam kolom, dapat digunakan pre kolom yang sesuai. Dalam monografi tertentu, mungkin diperlukan efisiensi kolom minimum. Efisiensi kolom dinyatakan dengan rumus:

$$\frac{16 t^2 R}{LY^2}$$

t^2R = jarak dalam cm. sepanjang garis dasar antara titik injek dan proyeksi titik puncak kurva yang dihasilkan oleh standar internal yang tertera pada monografi.

L = panjang kolom dalam meter.

Y = lebar kurva yang dihasilkan oleh standar internal.

Jika yang diperiksa larutan dalam air dan gunakan detektor ionisasi nyala, hasilnya tidak benar bila air dievakuasi pada waktu yang sama dengan komponen yang dikehendaki. Untuk mendapatkan sensitivitas alat yang sesuai dan jumlah volume larutan injek yang sesuai sampai diperoleh respon yang cukup baik,

lakukan percobaan dengan menggunakan larutan I. Kadar standar internal jika perlu diatur, sampai respon standar internal pada alat pencatat hampir sama dengan respon zat uji. Buat kromatogram diferensial dengan injek sejumlah volume yang telah dipilih dari larutan I melalui injektor pada kolom kromatografi yang dipertahankan pada suhu yang sesuai dan dieluasi dengan gas pembawa. Ulangi penetapan dua kali. Buat kromatogram dengan cara yang sama menggunakan larutan II dan III dengan volume sama. Ukur luas kurva, atau jika faktor simetri terletak antara 0,95 dan 1,05, ukur tinggi kurva yang dihasilkan oleh zat uji, zat standar dan standar internal. Jika kurva campuran mempunyai waktu tambat yang sama dengan waktu tambat standar internal. Hitung luas kurva tersebut. Dari nilai yang diperoleh dihitung kadar zat uji. Faktor simetri kurva dihitung dengan rumus :

$$\frac{Y_x}{2A}$$

Y_x = lebar kurva pada ketinggian 1/20 dari tinggi kurva.

A = jarak antara proyeksi titik puncak kurva pada garis mendatar pada ketinggian 1/20 dari tinggi kurva sampai titik potong garis mendatar tersebut dengan garis kurva.

Hasil penetapan dianggap benar, jika resolusi antara kurva yang diukur pada kromatogram lebih besar dari 1,0. Resolusi dihitung dengan rumus :

$$\frac{2(t_{Rb} - t_{Ra})}{Y_a + Y_b}$$

t_{Rb} dan t_{Ra} = jarak sepanjang garis dasar antara titik awal dan proyeksi titik puncak dari 2 kurva yang berdekatan.

Y_a dan Y_b = lebar kurva.

Kromatografi Cair

Kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang sensitif telah menyebabkan perubahan kromatografi kolom cair menjadi suatu sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi. Metode ini dikenal sebagai kromatografi cair kinerja tinggi. Teknik kromatografi cair dalam banyak hal dapat menghasilkan pemisahan yang sangat cepat seperti pada kromatografi gas, dengan keunggulan zat-zat yang tidak menguap atau tidak tahan panas dapat menggunakan kromatografi tanpa peruraian atau tanpa perlunya membuat derivat yang dapat menguap. Fase diam dapat berupa cairan atau polimer, yang di saluti atau terikat secara kimia pada permukaan penyangga sebagai lapisan tipis, yang mengurangi hambatan terhadap pemindahan berat, sampai keseimbangan antara fase gerak dan fase diam dapat tercapai dengan cepat. Suatu fase diam cair harus mempunyai sifat praktis tak bercampur dengan fase gerak, umumnya fase gerak perlu dijenuhkan terlebih dahulu dengan fase diam cair, agar fase diam tidak terbawa dari kolom. Fase diam berupa polimer yang

disalutkan pada penyangga umumnya lebih dapat bertahan. Suatu fase diam yang terikat secara kimia pada penyangga lebih mudah pemakaiannya dengan beraneka ragam pelarut serta suhu yang lebih tinggi. Tiga bentuk kromatografi cair kinerja tinggi yang paling, banyak digunakan adalah penukar ion, partisi dan adsorpsi.

Kromatografi penukar ion terutama digunakan untuk pemisahan zat-zat larut dalam air yang ionik atau dapat terionisasi dengan bobot molekul kurang dari 1500. Fase diam pada kromatografi penukar ion umumnya resin organik sintetik dengan gugus aktif yang berbeda-beda. Pada resin penukar kation terdapat gugus aktif yang bermuatan negatif dan resin ini digunakan untuk pemisahan zat-zat bersifat basa, misalnya amina. Sebaliknya pada kromatografi penukar anion terdapat gugus aktif bermuatan positif yang akan menarik zat-zat dengan gugus fosfat, sulfonat atau karboksilat yang bermuatan negatif. Senyawa larut air yang ionik atau yang dapat terionisasi akan mengalami tarikan oleh resin dan perbedaan dalam afinitas akan menyebabkan terjadinya pemisahan kromatografi. pH fase gerak, suhu, jenis ion, konsentrasi ionik, dan senyawa organik tertentu yang berfungsi untuk memodifikasi dapat mempengaruhi tertariknya zat terlarut, dan variabel variabel tersebut dapat diatur agar diperoleh derajat pemisahan yang diinginkan.

Pada kromatografi partisi digunakan fase gerak dan fase diam dengan polaritas yang berbeda. Jika fase gerak bersifat polar dan fase diam non polar, dikenal sebagai kromatografi fase terbalik, maka senyawa non polar yang larut dalam hidrokarbon dengan bobot molekul kurang dari 1000, seperti vitamin larut lemak dan antraknon dapat dipisahkan berdasarkan atas afinitas terhadap fase diam. Modifikasi pelarut fase gerak yang polar dengan pelut kurang polar menyebabkan berkurangnya afinitas serta tertambatnya senyawa pada kolom. Jika fase gerak non polar dan fase diam polar, seperti golongan alkohol dan amina dapat dikromatografi. Fase gerak yang non polar dapat dimodifikasi dengan suatu pelarut yang lebih polar untuk mengurangi tahanan dan mengubah pemisahan. Beraneka ragam senyawa non ionik dapat dikromatografi dengan kromatografi adsorpsi, dengan memilih fase diam dan fase gerak yang sesuai.

Peralatan

Kromatografi cair terdiri dari sistem pompa, injektor analit, kolom kromatografi, detektor, penguat sinyal dan perekam. Sistem pompa tekanan tinggi mengalirkan pelarut fase gerak dari bejana pelarut ke kolom melalui pipa tekanan tinggi. Dua cara digunakan untuk memasukan analit ke dalam kolom, yaitu injek ke dalam arus yang mengalir dan injek waktu alir berhenti. Teknik tersebut dapat dilakukan menggunakan injektor atau katup injektor. Teknik injeksi dengan injektor, dapat digunakan suatu septum apabila tekanan pada bagian atas kolom kurang dari 70 atmosfer (lebih kurang 1000 psi). Pada tekanan yang lebih tinggi dapat digunakan suatu katup injektor untuk memasukan zat uji. Beberapa sistem katup

mempunyai suatu tabung lingkaran terkalibrasi yang diisi dengan zat uji, yang kemudian dipindahkan oleh sistem katup ke dalam fase gerak yang mengalir. Sistem katup lainnya memungkinkan analit dimasukkan ke dalam rongga dengan menggunakan injektor. Rongga yang terisi tersebut kemudian oleh sistem katup dialihkan ke dalam arus bertekanan tinggi. Pada teknik aliran berhenti, aliran kolom dihentikan dan setelah tekanan pada injektor turun sampai nol, injektor dibuka dan analit disuntikan dengan memakai injektor. Kemudian injektor ditutup dan pompa dijalankan kembali. Tekanan dengan cepat tercapai kembali dan zona penyebaran kecil dalam proses ini. Teknik aliran berhenti, memberikan injeksi berulang pada tekanan tinggi yang lebih baik dari pada kalau menggunakan septum. Masalah rusaknya septum oleh berbagai pelarut dengan demikian juga dapat dihindari.

Kolom analitik yang digunakan untuk pemisahan umumnya mempunyai diameter dalam yang kecil antara 2–4 mm; kolom dengan diameter yang lebih besar digunakan untuk keperluan preparatif. Kolom dapat dipanaskan agar dihasilkan pemisahan yang lebih efisien, tetapi suhu di atas 60°C jarang digunakan, karena mungkin akan terjadi penguraian fase diam ataupun penguapan fase gerak. Bila tidak dinyatakan lain pada monografi, maka kolom dipertahankan pada suhu kamar.

Detektor yang umumnya dipakai meliputi fotometer ultraviolet, refraktometer diferensial dan fluorometer.

Fotometer ultraviolet mempunyai batas kepekaan kurang dari 1 mg. Ruang lingkup bertambah luas lagi dengan pemakaian spektrofotometer yang dilengkapi dengan kuvet mikro serta detektor yang dapat dioperasikan dengan berbagai panjang gelombang.

Refraktometer diferensial mendeteksi perbedaan indeks bias pelarut murni dan indeks bias larutan zat uji dalam pelarut tersebut. Namun demikian detektor ini kurang peka dengan batas deteksi kurang dari 1 µg serta peka terhadap perubahan kecil dalam komposisi pelarut, laju alir dan suhu, sampai perlu dipakai suatu kolom dan aliran fase gerak standar untuk memperoleh garis dasar yang memuaskan.

Fluorometer merupakan detektor yang peka untuk senyawa yang dapat berfluoresensi atau dapat diubah menjadi senyawa turunannya yang berfluoresensi dengan jalan perubahan kimia atau dengan reaksi penggabungan dengan pereaksi yang berfluoresensi pada gugus fungsional yang spesifik. Untuk beberapa pereaksi, pembuatan senyawa turunan dilakukan sebelum pemisahan kromatografi. Pada pendekatan lain, pereaksi dimasukkan ke dalam aliran fase gerak dan bereaksi langsung dengan analit secara insitu dan senyawa turunannya yang terbentuk diukur oleh detektor.

Suatu detektor elektrokimia mempunyai keunggulan jika dipakai untuk mengukur senyawa mudah teroksidasi, terutama golongan fenol dan katekol yang sangat kecil.

Pada umumnya, sinyal yang berasal dari detektor diperkuat terlebih dahulu sebelum disampaikan ke

alat perekam otomatis yang sesuai, dalam hal ini sinyal merupakan fungsi waktu, dapat pula sinyal dikirimkan ke integrator digital elektronik untuk mengukur luas puncak kromatogram secara otomatis.

Komposisi fase gerak berpengaruh nyata terhadap kinerja kromatografi dan harus terkontrol. Komposisi dapat mempunyai pengaruh yang jauh lebih besar terhadap faktor kapasitas daripada suhu, (faktor kapasitas = k adalah perbandingan waktu yang diperlukan selama fase diam terhadap waktu yang diperlukan selama dalam fase gerak). Pada kromatografi partisi dan adsorpsi, fase gerak dapat dimodifikasi dengan pelarut yang lain, sedangkan pada kromatografi penukar ion, baik pH dan kekuatan ion maupun modifikasi pelarut dapat mengubah faktor kapasitas. Teknik mengubah pelarut secara berkesinambungan selama berlangsungnya kromatografi dinamakan sistem bertingkat atau gradien dan kadang-kadang digunakan untuk kromatografi dari contoh yang kompleks yang terdiri dari komponen dengan faktor kapasitas yang perbedaannya besar.

Detektor yang peka terhadap perubahan pelarut, seperti refraktometer diferensial lebih sukar untuk digunakan dengan teknik elusi bertingkat atau gradien.

Prosedur

Identifikasi senyawa dan teknik kalibrasi dan reduksi data yang digunakan dalam kromatografi cair kinerja tinggi pada dasarnya sama dengan dalam kromatografi gas. Untuk analisis kuantitatif yang akurat, detektor perlu mempunyai rentang linier yang luas dan komponen yang akan diukur harus dapat dibedakan dari zat pengganggu. Rentang dinamik linier diartikan sebagai rentang ukuran contoh dari batas deteksi minimum sampai maksimum yang masih memberikan respon sinyal detektor yang linier, yaitu respon puncak pada perekam berbanding lurus dengan kadar zat yang diuji.

Akar fleksibilitas maksimum dalam analisis kuantitatif, rentang ini harus mencakup lebih kurang tiga orde besaran. Baik tinggi puncak maupun luasnya dapat dihubungkan dengan konsentrasi contoh.

Istilah “respon puncak”, dinyatakan sebagai A_s untuk respon contoh dan A_{std} untuk respon standar, telah digunakan untuk menyatakan pengukuran dalam kromatografi. Istilah ini mencakup luas puncak serta pengukuran elektronik lainnya. Tinggi puncak mudah diukur, tetapi sangat dipengaruhi perubahan waktu tambat yang disebabkan oleh variasi suhu dan komposisi pelarut. Oleh karena itu, luas puncak dianggap parameter yang lebih akurat untuk pengukuran kuantitatif.

Respon detektor dapat dikalibrasi berdasarkan respon puncak dari standar yang kadarnya diketahui menggunakan prosedur standarisasi eksternal atau internal. Suatu kekurangan dalam kalibrasi eksternal, yaitu perbandingan langsung respon puncak yang diperoleh pada kromatografi contoh uji dan kadar tertentu standar yang bersangkutan, akurasi dan presisinya ditentukan oleh injeksi berulang analit. Oleh

karena keberulangan penyuntikan pada tekanan tinggi sangat bervariasi, hasil kuantitatif yang lebih baik umumnya diperoleh bila digunakan metode kalibrasi internal. Suatu standar internal dengan kadar yang diketahui ditambahkan pada larutan uji maupun larutan standar yang kadarnya diketahui, dan perbandingan respon puncak zat uji terhadap standar internal.

Secara normal terdapat variasi dalam peralatan, bahan dan teknik. Suatu pengujian kesesuaian sistem dapat digunakan untuk memastikan bahwa suatu sistem dapat digunakan.

Kesesuaian sistem

Bila memakai metode kromatografi, seperti kromatografi cair kinerja tinggi atau kromatografi gas, pada umumnya dikehendaki adanya kepastian kesesuaian dan keefektifan sistem operasional yang digunakan. Perlu dicatat bahwa pencantuman spesifikasi parameter tertentu dalam suatu monografi tidaklah berarti kondisi operasional lain yang sesuai tidak dapat digunakan. Penyesuaian kondisi operasional dapat dilakukan, agar diperoleh kondisi operasional dan kromatogram yang baik. Untuk memastikan keefektifan sistem operasional akhir, perlu dilakukan uji kesesuaian sebelum digunakan.

Pada hakekatnya pengujian semacam itu berdasarkan konsep, bahwa elektronik, peralatan, zat uji, dan kondisi operasional analitik membentuk satu sistem analitik tunggal yang dapat diuji fungsinya secara keseluruhan. Data spesifik dikumpulkan dari injek ulang larutan uji atau larutan standar. Data ini disesuaikan terhadap nilai maksimum dan minimum, seperti efisiensi, presisi internal, faktor ikutan, resolusi, waktu tambat, bentuk kurva kalibrasi, respon dan perolehan kembali, seperti yang tertera pada masing-masing monografi. Suatu parameter yang berguna adalah injek berulang dari larutan standar paling baik dinyatakan dalam standar deviasi relatif yang dapat dihitung. Bila digunakan standar internal:

$$X_i = R_s = \frac{r_s}{r_i}$$

r_s = respon puncak standar;

r_i = respon puncak standar internal, atau bila yang dimaksudkan adalah metode standar eksternal maka r_s = respon puncak.

Injek ulang larutan standar umumnya tertera dalam masing-masing monografi, hasil pengukuran dibandingkan untuk memastikan apakah persyaratan presisi telah dipenuhi. Bila tidak dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, untuk perhitungan digunakan data kromatogram lima kali hasil injek ulang, jika dinyatakan batas deviasi relatif 2,0% atau kurang, dan digunakan data kromatogram injek ulang enam kali, jika dinyatakan batas deviasi relatif lebih dari 2,0%. Akan bermanfaat pula jika ditentukan faktor ikutan untuk membatasi tidak simetri yang diperbolehkan. Faktor ikutan, T , didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak, W

0,05, dibagi oleh dua kali jarak f , dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak, jarak tersebut diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar. Untuk suatu puncak yang simetris, faktor ikutan T besarnya satu, dan besarnya harga T ini akan bertambah, jika kromatogram makin tampak berekor. Harga resolusi, R , disyaratkan, untuk memastikan terpisahnya komponen yang terelusi berdekatan, untuk memastikan efisiensi pemisahan sistem secara umum, atau bila digunakan standar internal.

Larutan Volumetrik

Larutan volumetrik terdiri dari larutan normal dan larutan molar, dibuat dari zat pereaksi atau zat standar. Kecuali dinyatakan lain:

Larutan normal. Larutan mempunyai kekuatan 1 normal (1 N), jika tiap 1000 ml larutan mengandung 1 gram ekuivalen zat aktif.

Larutan molar. Larutan mempunyai kekuatan 1 molar (1 M), jika tiap 1000 ml larutan mengandung 1 gram molekul zat aktif.

Semua larutan volumetrik, baik yang dibuat dengan cara melarutkan atau mengencerkan larutan volumetrik yang lebih pekat, sebelum distandarisasi harus dicampur dengan pengocokan. Oleh karena konsentrasi larutan volumetrik dapat berubah selama penyimpanan, konsentrasinya harus selalu distandarisasi.

Jika larutan volumetrik terdapat dalam beberapa konsentrasi, cara pembuatan dan pembakuan yang terperinci hanya diuraikan untuk larutan yang sering digunakan.

Pembuatan dan pembakuan larutan yang lebih pekat atau lebih encer dilakukan dengan cara yang sama menggunakan pereaksi yang sebanding.

Untuk larutan volumetrik dengan konsentrasi lebih rendah, dapat dibuat dengan cara pengenceran saksama larutan volumetrik lebih pekat dan perlu dilakukan standarisasi.

Larutan volumetrik yang sangat encer dan tidak stabil misalnya kalium permanganat 0,01 M dibuat dengan pengenceran saksama larutan volumetrik pekat dengan air, jika perlu dengan air bebas karbon dioksida. Kecuali dinyatakan lain larutan volumetrik dibuat menurut cara yang tertera di bawah ini.

Amonium tiosianat 0,1 M

Tiap 1000,0 ml mengandung 7,612 g NH_4SCN (BM: 76,12).

Pembuatan. Larutkan dan encerkan 8 g dalam air sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Masukkan 30,0 ml perak nitrat 0,1 M ke dalam labu bersumbat kaca. Encerkan dengan 50 ml air, tambahkan 2 ml asam nitrat. Titrasi dengan larutan amonium tiosianat menggunakan indikator larutan besi (III) amonium sulfat sampai tepat mulai terjadi warna coklat merah. Hitung normalisasi larutan.

Asam hidroklorida 1 M

Tiap 1000,0 ml mengandung 36,46 g HCl (BM: 36,46)

Pembuatan. Larutkan dan encerkan 36,46 g asam hidroklorida dalam air sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan larutan 1 M. Larutkan dan encerkan 1,5 g natrium karbonat anhidrat (yang sebelumnya telah dikeringkan pada suhu 270°C selama 1 jam) dalam air sampai batas volume 100 ml. Titrasi dengan asam hidroklorida 1 M menggunakan indikator larutan merah metil. Panaskan larutan sampai mendidih, dinginkan dan lanjutkan titrasi. Panaskan lagi sampai mendidih dan titrasi lagi sampai warna merah muda tetap dengan pendidihan lagi. Hitung molaritas larutan. Setiap ml asam hidroklorida 1 M setara dengan 52,99 mg natrium karbonat anhidrat.

Asam oksalat 0,1 M

Tiap 1000,0 ml mengandung 6,303 g $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$ (BM: 126).

Pembuatan. Larutkan dan encerkan 6,303 g asam oksalat dalam air sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Titrasi dengan kalium permanganat 0,1 M. Hitung molaritas larutan.

Asam periodat 0,1 M

Tiap 1000,0 ml mengandung 22,79 g $HIO_4 \cdot 2H_2O$ (BM: 228).

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan dan encerkan 22,79 g $HIO_4 \cdot 2H_2O$ dalam air sampai batas volume 1000 ml.

Pembakuan. Pada 25,0 ml, tambah 30 ml larutan kalium iodida, biarkan selama 1 menit. Titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M, gunakan larutan kanji sebagai indikator.

Asam perklorat 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 10,05 g $HClO_4$ (BM: 100,5)

Pembuatan larutan 0,1 M. Campur 8,5 ml asam perklorat (70%) dengan 500 ml asam asetat glasial dan 21 ml asetat anhidrat dinginkan, tambah asam asetat glasial sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Larutkan dan encerkan 700 mg kalium biftalat (dikeringkan pada suhu 120°C selama 2 jam) dalam asam asetat glasial sampai batas volume 50 ml. Tambah 2 tetes kristal violet, titrasi dengan larutan asam perklorat sampai terbentuk warna hijau kebiruan. Lakukan titrasi blanko. Hitung molaritas larutan. Setiap ml asam perklorat 0,1 M setara dengan 20,42 mg kalium biftalat.

Asam sulfat 1 M

Tiap 1000 ml larutan mengandung 98,08 g H_2SO_4 (BM: 98,08)

Pembuatan larutan 1 M. Larutkan dan encerkan 98,08 g H_2SO_4 dalam air sampai batas volume 1000 ml.

Pembakuan. Lakukan pembakuan seperti tertera pada asam hidroklorida 1 M.

Asam sulfat-etanol 0,1 M

Tiap 1000 ml larutan mengandung 49,04 g H_2SO_4 (BM: 98,08)

Pembuatan larutan 0,1 M. Tambah dengan hati-hati dengan pengadukan 2,78 ml asam sulfat dalam etanol absolut sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Lakukan pembakuan seperti tertera pada asam hidroklorida 1 M.

Barium perklorat 0,01 M

Tiap 1000 ml larutan mengandung 3,362 g $Ba(ClO_4)_2$ (BM: 336,2)

Pembuatan larutan 0,01 M. Larutkan dan encerkan 3,362 g $Ba(ClO_4)_2$ dalam air sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Pada 5 ml asam sulfat 0,05 M, tambah 5 ml air, 50 ml dapar asetat pH 3,7 dan 0,5 ml larutan alizarin S dan titrasi dengan larutan barium perklorat sampai terbentuk warna merah orange. Setiap ml asam sulfat 0,05 M setara dengan 16,81 mg $Ba(ClO_4)_2$.

Besi (II) amonium sulfat 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 39,21 g $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (BM: 392,13).

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan 39,21 g besi (II) amonium sulfat dalam 100 ml asam sulfat 2 M dan encerkan dengan air (sebelumnya telah didinginkan) sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Pada 25 ml, tambah 10 ml asam sulfat 1 M dan 1 ml asam ortofosforat. Titrasi dengan kalium permanganat 0,02 M. Setiap ml kalium permanganat 0,02 M setara dengan 39,21 mg $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$.

Besi (II) sulfat 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 27,80 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (BM: 278,0)

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan 27,80 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ dalam 500 ml asam sulfat 1 M dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml.

Pembakuan. Pada 25 ml larutan, tambah 3 ml asam ortofosforat dan titrasi dengan kalium permanganat 0,02 M. Setiap ml kalium permanganat 0,02 M setara dengan 27,80 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$.

Besi (III) amonium sulfat 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 48,22 g $NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (BM: 482,2)

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan 48,22 g besi (III) amonium sulfat dalam campuran 6 ml asam sulfat dan 300 ml air, encerkan dengan air sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Pada 25 ml larutan, tambah 3 ml asam hidroklorida dan 2 g kalium iodida, diamkan selama 10 menit dan titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M, gunakan kanji mucilage sebagai indikator. Setiap ml natrium tiosulfat 0,1 M setara dengan 48,22 g $NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$.

Dinatrium edetat 0,1M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 37,22 g $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ (BM: 372,2).

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan 37,22 g $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ (dalam 500 ml air, tambah 100 ml natrium hidroksida 1 M dan encerkan dengan air sampai volume 1000 ml.

Pembakuan. Larutkan 0,12 g serbuk seng dalam 4 ml asam hidroklorida 7 M dan tambah 0,1 ml air brom. Didihkan sampai uap brom hilang, dinginkan, tambah natrium hidroksida 2 M sampai larutan menjadi sedikit asam atau netral. Lakukan titrasi kompleksometri menggunakan seng. Setiap ml dinatrium edetat setara dengan 6,54 mg Zn.

Iodium 0,5 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 126,9 g I (BM: 235,8)

Pembuatan larutan 0,5 M. Larutkan dan encerkan 126,9 g iodium dan 200 g kalium iodida dalam air sampai batas volume 1000 ml.

Pembakuan. Pada 2 ml larutan, tambah 1 ml asam asetat 2 M dan 50 ml air. Titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M menggunakan larutan kanji sebagai indikator. Setiap ml natrium tiosulfat 0,1 M setara dengan 12,69 mg I.

Kalium arsenit 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 7,301 g $KAsO_2$.

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan 4,9455 g arsen trioksida (yang telah diserbukkan dan dikeringkan pada suhu 105°C sampai bobot tetap) dalam 75 ml kalium hidroksida 1 N. Tambah 40 g kalium bikarbonat, larutkan dalam 200 ml air, encerkan dengan air sampai batas volume 1000,0 ml.

Kalium biftalat 0,1 M (kalium hidrogenftalat 0,1 M)

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 20,42 g $C_8H_5O_4K$ (BM: 204,2)

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan 20,42 g kalium hidrogenftalat dalam 800 ml asam asetat anhidrat, panaskan di atas penangas air sampai larut sempurna, dinginkan sampai suhu 20°C dan encerkan dengan asam asetat anhidrat sampai batas volume 1000 ml.

Kalium dikromat 0,0167 M

Tiap 1000,0 ml mengandung 4,9 g $K_2Cr_2O_7$ (BM: 294,2)

Pembuatan larutan 0,0167 M. Larutkan dan encerkan 4,9 g kalium dikromat dalam air sampai batas volume 1000,0 ml

Pembakuan. Pada 20 ml larutan, tambah 1 g kalium iodida, 7 ml asam hidroklorida 2 M dan 250 ml air. Titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M, menggunakan 3 ml larutan kanji sebagai indikator sampai terbentuk warna hijau terang. Setiap ml natrium tiosulfat 0,1 M setara dengan 4,9 mg $K_2Cr_2O_7$.

Kalium bromat 0,02 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 3,340 g $KBrO_3$ (BM: 167)

Pembuatan larutan 0,02 M. Larutkan dan encerkan 3,340 g kalium bromat dalam air sampai batas volume 1000,0 ml.

Kalium hidroksida 1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 56,11 g KOH (BM: 56,11)

Pembuatan larutan 1 M. Larutkan dan encerkan 56,11 g kalium hidroksida dalam air bebas dioksida sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Titrasi 20 ml larutan dengan asam hidroklorida 1 M, gunakan 0,5 ml fenolftalen sebagai indikator. Setiap asam hidroklorida 1 M setara dengan 56,11 mg KOH.

Kalium hidroksida-etanol 0,5 M

Tiap 100 ml larutan mengandung 28,06 g KOH (BM: 56,11)

Pembuatan larutan 0,5 M. Larutkan 28,06 g kalium hidroksida dalam 5 ml air dan encerkan dengan etanol bebas aldehid (96%) sampai volume 100 ml.

Pembakuan. Titrasi 20 ml larutan dengan asam hidroklorida 0,5 M, gunakan 0,5 ml fenolftalen sebagai indikator. Setiap asam hidroklorida 0,5 M setara dengan 28,06 mg KOH.

Kalium iodat 0,05 M

Tiap 1000 ml larutan mengandung 10,7 g KIO_3 (BM: 214)

Pembuatan larutan 0,05 M. Larutkan dan encerkan 10,7 kalium iodat dalam air sampai batas volume 1000 ml.

Pembakuan. Encerkan 25 ml larutan dengan air sampai batas volume 100 ml. Pada 20 ml larutan, tambah 2 g kalium iodida dan 10 ml asam sulfat encer. Titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M, gunakan 1 ml larutan kanji sebagai indikator. Setiap ml natrium tiosulfat 0,1 M setara dengan 3,566 mg KIO_3 .

Kalium permanganat 0,02 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 3,161 g $KMnO_4$ (BM: 158)

Pembuatan larutan 0,02 M. Larutkan dan encerkan 3,161 g kalium permanganat dalam 1000 ml air, panaskan di atas penangas air selama 1 jam, dinginkan dan saring dengan gelas penyaring.

Pembakuan. Pada 20 ml larutan, tambah 2 g kalium iodida dan 10 ml asam sulfat 1 M. Titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M, gunakan 1 ml larutan kanji sebagai indikator. Setiap ml natrium tiosulfat 0,1 M setara dengan 3,161 mg $KMnO_4$.

Litium metoksida 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 0,694 g Li.

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan 0,694 g litium

dalam 150 ml metanol anhidrat, dan encerkan dengan toluen sampai batas volume 1000 ml.

Pembakuan. Pada 10 ml dimetilformamid, tambah 0,05 ml biru timol 0,3% b/v dalam metanol. Titrasi dengan larutan litium metoksida sampai terbentuk warna biru. Segera tambah 0,2 g asam benzoat, aduk dan titrasi dengan litium metoksida sampai warna biru tetap. Setiap ml litium metoksida 0,1 M setara dengan 12,21 mg $C_7H_6O_2$.

Magnesium sulfat 0,05 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 12,325 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (BM: 246,5)

Pembuatan larutan 0,05 M. Larutkan dan encerkan 12,325 g magnesium sulfat dalam air sampai batas volume 1000 ml.

Pembakuan. Lakukan titrasi kompleksometri, gunakan 40 ml larutan magnesium sulfat. Setiap ml dinatrium edetat setara dengan 24,65 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Natrium arsenit 0,1 M (BM: 49,46)

Pembuatan. Larutkan 4,946 g arsenitrioksida dalam campuran 20 ml larutan natrium hidroksida dan 20 ml air, encerkan dengan air sampai batas volume 400 ml, tambah asam hidroklorida 2 M sampai larutan netral, gunakan kertas lakmus. Larutkan dan encerkan 2 g natrium bikarbonat dengan air sampai 500,0 ml.

Natrium hidroksida 1 M

Tiap 1000 ml larutan mengandung 40 g natrium hidroksida (BM:40).

Pembuatan larutan 1 M. Larutkan 40 g natrium hidroksida dalam air bebas karbondioksida sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Titrasi 20 ml larutan dengan asam hidroklorida 1 M menggunakan indikator yang sesuai pada penetapan kadar. Setiap ml asam hidroklorida 1 M setara dengan 40,0 mg NaOH.

Jika natrium hidroksida 0,1 M digunakan pada penetapan kadar garam halida dari basa organik. Larutkan 0,1 g asam benzoat dalam campuran 5 ml asam hidroklorida 0,01 M dan 50 ml etanol (96%). Titrasi dan catat penambahan volume pada dua titik infleksi. Setiap ml asam hidroklorida 0,1 M setara dengan 12,21 mg $C_7H_6O_2$.

Natrium hidroksida-etanol 0,1 M.

Tiap 1000 ml larutan mengandung 4,0 g natrium hidroksida (BM:40).

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan 4,0 g natrium hidroksida 10 M dengan etanol absolut sampai volume 250 ml.

Pembakuan. Larutkan 0,2 g asam benzoat dalam campuran 10 ml etanol (96%) dan 2 ml air. Titrasi dengan natrium hidroksida etanol menggunakan 0,2 larutan timolftalein sebagai indikator. Setiap ml natrium hidroksida etanol 0,1 M setara dengan 12,21 mg $C_7H_6O_2$.

Natrium metoksida 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 5,402 g CH_3ONa (BM:54,02)

Pembuatan larutan 0,1 M. Dinginkan 175 ml metanol anhidrat dalam air es dan tambah 2,5 g Na. Encerkan dengan toluen sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Pada 10 ml dimetilformamida, tambah 0,05 ml biru timol 0,3% b/v dalam metanol. Titrasi dengan natrium metoksida sampai terbentuk warna biru. Segera tambah 0,2 g asam benzoat, aduk dan titrasi kembali sampai warna biru tetap. Setiap ml natrium metoksida 0,1 M setara dengan 12,21 mg $C_7H_6O_2$.

Natrium nitrit 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 6,900 $NaNO_2$ (BM:69)

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan 6,900 g natrium nitrit dalam air sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Larutkan 0,3 g asam sulfanilat dalam 50 ml asam hidroklorida 2 M, tambah 3 g kalium bromida, dinginkan dalam air es. Titrasi dengan natrium nitrit 0,1 M tetapkan titik akhir.

Natrium tetrafenilborat 0,01 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 3,422 g $NaB(C_6H_5)_4$ (BM:342,2).

Pembuatan larutan 0,01 M. Larutkan 3,5 g natrium tetrafenilborat dalam 50 ml air, aduk selama 20 menit dengan 0,5 g aluminium hidroksida gel, tambahkan 250 ml air dan 16,6 g natrium klorida dan diamkan selama 30 menit. Saring, tambahkan 600 ml air, atur pH 8,0 – 9,0 dengan natrium hidroksida dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Larutkan 7 mg kalium klorida (sebelumnya dikeringkan pada suhu 150°C selama 1 jam) dalam 5 ml dapar asetat pH 3,7 dan 5 ml air, tambah 15 ml larutan natrium tetrafenil borat, diamkan selama 5 menit dan saring. Pada 20 ml hasil saringan, tambah 0,5 ml biru bromofenol dan titrasi dengan setilpiridinum klorida 0,005 M sampai terbentuk warna biru. Lakukan titrasi blanko. Molaritas larutan dengan rumus:

$$\frac{a w}{[15 (a - b) 0,07455]}$$

a = volume setilpiridinum klorida 0,005 M saat titrasi blanko (ml).

b = volume setilpiridinum klorida 0,005 M saat titrasi uji (ml).

w = berat kalium klorida (g)

Natrium tiosulfat 0,1 M

Tiap 1000 ml larutan mengandung 24,82 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ (BM: 248,2).

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan dan encerkan 24,82 g natrium tiosulfat dan 0,2 g natrium karbonat dalam air bebas karbon dioksida sampai batas volume 1000 ml.

Pembakuan. Pada 20 ml kalium bromat 0,0167 M, tambah 40 ml air, 10 ml larutan kalium iodida dan 5 ml asam hidroklorida 7 M. Titrasi dengan larutan natrium tiosulfat, menggunakan 1 ml larutan kanji sebagai indikator. Setiap ml natrium tiosulfat 0,1 M setara dengan 2,784 mg KBrO_3 .

Perak nitrat 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 16,99 g AgNO_3 (BM: 169,9)

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan dan encerkan 16,99 g perak nitrat dalam air sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Larutkan 0,1 g natrium klorida dalam 30 ml air. Titrasi dengan perak nitrat, tentukan titik akhir secara potensiometrik. Setiap ml perak nitrat 0,1 M setara dengan 5,844 mg NaCl .

Seng klorida 0,05 M

Tiap 1000 ml larutan mengandung 6,815 g ZnCl_2 (BM: 136,3).

Pembuatan larutan 0,05 M. Larutkan 6,815 g seng klorid dalam air sampai batas volume 1000,0 ml

Pembakuan. Pada 20 ml larutan, tambah 5 ml asam asetat 2 M. Lakukan titrasi kompleksometri. Setiap ml dinatrium edetat 0,1 M setara dengan 13,63 mg ZnCl_2 .

Seng sulfat 0,1 M

Tiap 1000,0 ml mengandung 28,75 g ZnSO_4 (BM: 287,5)

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan dan encerkan 28,75 g seng sulfat dalam air sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Pada 20 ml larutan, tambah 5 ml asam asetat 2 M dan lakukan titrasi kompleksometri. Setiap ml dinatrium edetat 0,1 M setara dengan 28,75 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Serium (IV) amonium sulfat 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 63,26 g $2(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan 63,26 g serium (IV) amonium sulfat dalam campuran 30 ml asam sulfat dan 500 ml air, dinginkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Pada 25 ml larutan, tambah 2 g kalium iodida dan 150 ml air. Titrasi dengan natrium tiosulfat setara dengan 63,26 g $2(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Serium (IV) sulfat 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 40,43 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (BM: 404,3).

Pembuatan larutan 0,1 M Larutkan 40,43 g serium (IV) sulfat dalam campuran 500 ml air dan 50 ml asam sulfat (96% b/b). Dinginkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml.

Pembakuan Pada 25 ml larutan, tambah 2 g kalium iodida, 150 ml air dan 1 ml larutan kanji. Titrasi dengan

natrium tiosulfat 0,1 M. Setiap ml natrium tiosulfat 0,1 M setara dengan 40,43 mg $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Tetrabutylamonium hidroksida 0,1 M

Tiap 1000,0 ml larutan mengandung 25,95 g $\text{C}_{16}\text{H}_{37}\text{NO}$ (BM: 259,5).

Pembuatan larutan 0,1 M. Larutkan 40 tetrabutylamonium iodida dalam 90 ml metanol anhidrat, tambah 20 g serbuk perak oksida dan kocok dengan kuat selama 1 jam. Setrifus beberapa ml dari campuran dan cairan supernatan untuk iodida. Jika reaksi iodida menunjukkan positif, tambah 2 g perak oksida dan kocok selama 30 menit. Ulangi tahap ini sampai campuran bebas iodida, saring dengan gelas penyaring dan bilas gelas penyaring dengan 3 kali masing-masing 50 ml toluen. Tambah hasil pembilasan ke dalam hasil saringan dan tambah dengan toluen sampai batas volume 1000 ml. Lewatkan larutan dengan nitrogen bebas karbon dioksida selama 5 menit.

Pembakuan. Pada 10 ml dimetilformamid, tambah 0,05 ml biru timol 0,3 % b/v dalam metanol. Titrasi dengan tetrabutylamonium hidroksida sampai terbentuk warna biru. Segera tambah 0,2 g asam benzoat, aduk dan titrasi dengan tetrabutylamonium hidroksida sampai warna biru tetap. Setiap ml tetrabutylamonium hidroksida 0,1 M setara dengan 12,21 mg $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$.

Timbal (II) nitrat 0,05 M

Tiap 1000 ml larutan mengandung 16,56 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (BM: 331,2)

Pembuatan larutan 0,05 M. Larutkan dan encerkan 16,56 g timbal (II) nitrat dalam air sampai batas volume 1000,0 ml.

Pembakuan. Pada 50 ml larutan, tambah 300 ml air. Lakukan dengan metode titrasi kompleksometri. Setiap ml dinatrium edetat 0,1 M setara dengan 33,12 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Pembakaran Labu Oksigen

Peralatan

Labu iodium kapasitas antara 300 ml dan 500 ml. Pada sumbat labu, dileburkan pada salah satu ujung kawat platina panjang 13 cm, diameter 1 mm. Pada ujung lain kawat platina dilekatkan kasa platina yang digunakan untuk memegang zat uji. Kasa platina berukuran lebar lebih kurang 2 cm dan panjang 1.5 cm dan memenuhi ukuran pengayak no 24.

Prosedur

Zat uji dalam kertas saring, panjang lebih kurang 5 cm, lebar lebih kurang 3 cm. Masukkan hati-hati bungkus ke dalam kasa platina dan sisipkan ujung lembar pita kertas saring. Hembuskan oksigen ke dalam labu. Basahkan mulut labu dengan air, isikan cairan penyerap yang tertera pada masing-masing monografi ke dalam labu. Isikan oksigen ke dalam labu, nyalakan ujung pita kertas saring. Masukkan segera. Sumbat

labu, tekan dengan kuat. Jika nyala mulai membesar, balikkan labu dengan hati-hati sampai cairan menjadi penyekat tanpa mengakibatkan jatuhnya zat yang belum terbakar sempurna. Segera setelah pembakaran sempurna, kocok labu dengan kuat selama 5 menit. Teteskan beberapa ml air disekitar sumbat, buka sumbat dengan hati-hati, bilas sumbat, kawat platina dan sisi labu dengan air. Lanjutkan pengujian menurut cara yang tertera pada masing-masing monografi.

Sejumlah zat uji sebelum ditimbang lebih dahulu digerus halus dan dicampur sampai homogen, timbang sejumlah zat uji seperti yang tertera pada masing-masing monografi. Tempatkan zat uji cair pada kertas saring, dengan berat 15 mg dalam kapsul sambil menyisipkan sehelai kertas saring. Letakan dengan baik kapsul pada kasa platina.

Pemeriksaan Steroid

Pemeriksaan steroid meliputi identifikasi steroid, kemurnian steroid, uji terhadap steroid asing, penetapan kadar dan penetapan kadar steroid tunggal.

Identifikasi

Larutan standar. Larutkan standar steroid yang sesuai dalam campuran 9 volume kloroform dan 1 volume metanol sampai konsentrasi 2,5 mg/ml.

Larutan uji. Buat larutan uji menggunakan sejumlah zat atau hasil uji sesuai yang tertera pada masing-masing monografi dengan cara dan pelarut yang sama seperti pembuatan larutan standar sampai konsentrasi 2,5 mg/ml.

Prosedur

Lakukan metode kromatografi lapis tipis seperti yang tertera pada kromatografi, menggunakan silika gel G sebagai zat penjerap. Rendam lempeng kromatografi kering dalam bejana kromatografi mengandung larutan pengembang seperti yang tertera pada masing-masing monografi. Biarkan pelarut merambat sampai tepi atas, angkat lempeng, biarkan pelarut menguap, gunakan lempeng dalam waktu 7 jam.

Kecuali dinyatakan lain, totolkan terpisah masing-masing 2 μ l (1) larutan uji, (2) larutan standar dan (3) campuran larutan uji dan larutan standar dengan volume yang sama. Elusi dengan fase gerak seperti yang tertera pada monografi dengan arah sama. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Panaskan pada suhu 120°C selama 15 menit, semprot lempeng dalam keadaan panas dengan asam sulfat 10% v/v dalam etanol (95%).

Panaskan pada suhu 120°C selama 10 menit, dinginkan. Periksa bercak dengan cahaya ultraviolet (366 nm). Bercak utama larutan (1) sesuai dengan bercak utama larutan (2). Bercak larutan (3) merupakan bercak tunggal kompak. Pelarut yang digunakan:

1. Campuran 1 volume formaldehid dan 9 volume aseton

2. Campuran 1 volume propilenglikol dan 9 volume aseton
3. Campuran 1 volume parafin cair dan 9 volume petroleum eter

Fase gerak/larutan pengembang :

- A. Kloroform
- B. Campuran 3 volume toluen dan 1 volume kloroform.
- C. Toluena.
- D. Campuran 4 volume sikloheksan dan 1 volume toluena
- E. Campuran sikloheksan dan petroleum eter dengan volume yang sama.
- F. Campuran 2 volume asam asetat dan 3 volume air

Kemurnian

Larutan standar. Timbang standar seperti yang tertera pada masing-masing monografi, larutkan dalam campuran etanol (95%) dan kloroform dengan volume yang sama sampai konsentrasi 8 mg/ml.

Larutan uji. Gunakan larutan uji seperti yang tertera pada monografi.

Prosedur

Lakukan dengan metode kromatografi lapis tipis seperti yang tertera pada kromatografi, menggunakan :

Lempeng. Silika gel GF₂₅₄ atau yang sesuai.

Fase gerak. Seperti yang tertera pada monografi. Bagi lempeng menjadi 3 daerah yang sama, bagian kiri untuk larutan uji, bagian kanan untuk larutan standar sampai berupa garis dengan jarak 2,5 cm dari tepi bawah pada lempeng. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Periksa dengan cahaya ultraviolet (254 nm). Tandai bercak utama masing-masing larutan dan daerah blanko yang sesuai. Pindahkan secara kuantitatif setiap bercak ke dalam tabung sentrifus 50 ml bersumbat, tambah masing-masing dengan 25,0 ml etanol absolut, kocok selama 2 menit, sentrifus selama 5 menit dengan 1500 rpm. Ukur serapan pada panjang gelombang seperti yang tertera pada monografi.

Uji Terhadap Steroid Asing

Prosedur A

Larutan standar. Larutkan standar steroid yang sesuai dalam campuran 9 volume kloroform dan 1 volume metanol sampai konsentrasi 15 mg/ml.

Larutan uji. Buat larutan uji menggunakan sejumlah zat atau hasil pengerjaan sesuai yang tertera pada masing-masing monografi, dengan cara dan pelarut seperti pembuatan larutan standar sampai konsentrasi 15 mg/ml.

Penetapan. Lakukan pengujian dengan cara kromatografi lapis tipis seperti yang tertera pada kromatografi, menggunakan silika gel dan campuran 77 bagian diklormetan, 15 bagian eter, 8 bagian metanol dan 1,2 bagian air, sebagai larutan pengembang. Totolkan

terpisah masing-masing 1 µl (1) larutan uji, (2) larutan standar, (3) 0.03% b/v dalam campuran 9 volume kloroform dan 1 volume metanol, masing-masing prednisolon, prednison dan kortison asetat. Angkat lempeng, keringkan di udara sampai pelarut menguap, panaskan pada suhu 105°C selama 10 menit, dinginkan, semprot dengan larutan biru tetrazolium basa. Bercak utama larutan (1) sesuai pada jarak, warna, dan intensitas dengan bercak utarna larutan (2). Bercak tambahan larutan (1) tidak lebih intensif dari bercak larutan (3).

Prosedur B

Larutan standar. Buat larutan standar dan larutan uji dengan cara yang sama dan dengan kadar sama seperti yang tertera pada cara A.

Penetapan. Lakukan pengujian dengan cara kromatografi lapis tipis seperti yang tertera pada kromatografi, menggunakan silika gel G dan campuran 95 volume etilenklorida, 5 volume metanol dan 0,2 volume air sebagai larutan pengembang. Totolkan terpisah 1 µl (1) larutan uji, (2) larutan standar, (3) 0,03% b/v dalam campuran 9 volume kloroform dan 1 volume metanol, masing-masing prednison, prednison asetat, kortison asetat dan doksikorton asetat. Lanjutkan pengujian menurut cara yang tertera pada prosedur A.

Penetapan Kadar Steroid

Prosedur berikut digunakan untuk penetapan kadar steroid yang mempunyai gugusan mereduksi seperti α-keton.

Larutan standar. Timbang standar seperti yang tertera pada monografi yang sebelumnya telah dikeringkan menurut cara yang tertera pada monografi, larutkan dalam etanol (95%). Lakukan pengenceran bertingkat dengan etanol (95%) sampai konsentrasi 10 µg/ml. Pipet 20 ml larutan ke dalam labu erlenmeyer 50 ml bersumbat kaca.

Larutan uji. Buat larutan uji menurut cara yang tertera pada monografi.

Prosedur

Pada 2 labu masing-masing mengandung 20,0 ml larutan standar dan 20,0 ml larutan uji dan pada labu ketiga mengandung 20,0 ml etanol (95%) sebagai blanko, tambah 2,0 ml larutan (50 mg biru tetrazolium dalam 10 ml etanol (95%)). Kemudian pada masing-masing labu, tambah 2,0 ml campuran 1 volume tetrametilanium hidroksida dan 9 volume etanol (95%), aduk, biarkan dalam gelap selama 90 menit. Segera ukur serapan larutan standar, dan larutan uji pada panjang gelombang 525 nm. Hitung kadar steroid dengan rumus seperti yang tertera pada masing-masing monografi.

Penetapan Kadar Steroid Tunggal

Prosedur berikut digunakan untuk penetapan kadar steroid yang telah dipisahkan dari steroid asing sejenis dan zat lain, dengan cara kromatografi lapis

tipis menggunakan lempeng silika gel dengan zat berfluoresensi. Panaskan lempeng pada suhu 105°C selama 1 jam, simpan dalam desikator.

Pelarut A. Campur 180 volume metilen klorida dengan 16 volume metanol.

Pelarut B. Campur 4 volume kloroform dengan 1 volume aseton.

Larutan standar. Timbang standar seperti yang tertera pada monografi yang sebelumnya dikeringkan pada suhu 105°C selama 3 jam dan ditimbang. Larutkan dalam campuran kloroform dan etanol (95%) dengan volume yang sama, sampai konsentrasi 2 mg/ml.

Larutan uji. Buat larutan uji seperti yang tertera pada monografi.

Prosedur

Bagi lempeng menjadi 3 daerah yang sama, daerah kiri dan kanan masing-masing untuk larutan uji dan larutan standar dan bagian tengah untuk blanko. Totolkan terpisah masing-masing 200 µl larutan uji dan larutan standar sampai berupa garis dengan jarak 2,5 cm dari tepi bawah lempeng. Keringkan lempeng dengan aliran udara. Dengan menggunakan pelarut seperti yang tertera pada monografi, letakan dalam bejana kromatografi yang sesuai yang telah dijenuhkan, sampai pelarut merambat sejauh 15 cm di atas garis awal. Angkat lempeng, uapkan pelarut, periksa pita utama larutan standar dengan lampu ultraviolet. Tandai pita juga pita yang sesuai dari larutan uji dan blanko pada lempeng. Pindahkan silika gel dari masing-masing pita secara terpisah, ke dalam tabung sentrifus 50 ml bersumbat kaca. Pada masing-masing tabung tambahkan 25,0 ml etanol (95%) dan kocok selama 2 menit. Sentrifus selama 5 menit, pipet 20 ml supernatan dari masing-masing tabung ke dalam labu 50 ml bersumbat kaca, tambahkan 2,0 ml larutan yang dibuat dengan melarutkan 50 mg biru tetrazolium dalam 10 ml metanol, campur. Lanjutkan seperti yang tertera pada penetapan kadar steroid mulai dari "kemudian pada masing-masing labu tambahkan.....".

Penetapan Aktivitas Enzim

α-Amilase dan β-Amilase

Prinsip

Iodin kompleks dengan kanji akan memberikan warna yang akan terabsorbsi pada panjang gelombang 620 nm.

Aktivitas

Satu unit amilase (AU) setara dengan 1 mg kanji/ menit/ g enzim.

Kondisi

- Suhu: 37°C
- pH: 7, 2
- Waktu reaksi: 30 menit
- Konsentrasi: ion natrium 0,6 % b/b

Peralatan

- Penangas air 37°C
- Spektrofotometer
- Vortex mixer

Pereaksi

- Kanji (lintner)
- Kalium fosfat monobasa anhidrat
- Natrium fosfat dibasa anhidrat
- Natrium klorida
- Asam hidroklorida
- Kalium iodida
- Iodium
- Larutan
- Catatan: toleransi pH = 0,05
- **Substrat kanji.** Larutkan 12 g kanji dalam 75 ml air, masukan ke dalam labu erlenmeyer 1000 ml, tambah 300 ml air mendidih, dididihkan selama 3 menit, dinginkan dengan bantuan air yang mengalir. Pindahkan ke dalam labu 500 ml, tambah air sampai volume 500 ml. Periksa adanya material gelatin. Bila ada, tidak boleh digunakan. Buat larutan segar setiap minggu.
- **Dapar fosfat 0,2 M pH 7,2.** Larutkan 7,62 g kalium fosfat monobasa anhidrat dan 20,45 g natrium fosfat dibasa anhidrat dalam 1000 ml air, atur pH 7,2 dengan NaOH 1 M.
- **Natrium klorida 0,5 M.** Larutkan dan encerkan 29,227 g dalam air sampai batas volume 1000 ml.
- **Asam hidroklorida 1 M** Larutkan dan encerkan 36,5 g dalam air sampai batas volume 1000 ml.
- **Indikator iodin.** Larutkan 11 g kalium iodida dalam 150 ml air, tambah 5,5 g iodin, aduk dan tambah air sampai batas volume 250 ml, larutan harus segar.
- **Larutan uji.** Larutkan zat uji dalam 100 ml dapar fosfat 0,2 M pH 7,2, aduk.

Prosedur

Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan: Pada 5 ml kanji ke dalam tabung uji untuk hidrolisa sampel dan non hidrolisa blanko. Pipet 5 ml air ke dalam tabung uji dan blanko. Tambah masing-masing dengan 3 ml dapar fosfat dan 1 ml natrium klorida. Aduk selama 15 detik dalam penangas air pada suhu 37°C selama 10 menit. Tambah 1 ml larutan uji, aduk selama 15 menit. Inkubasi selama 30 menit. Tambah 2 ml asam hidroklorida 1 M, aduk selama 15 detik. Pada 1 ml, tambah 200 ml air dan 2,5 ml asam hidroklorida 1 M dan 1 ml standar iodin, aduk. Encerkan dengan air sampai volume 250 ml dan aduk. Untuk non hidrolisa dan blanko lakukan seperti zat uji hidrolisa, dengan pengecualian sebagai berikut ; tambah 1 ml larutan enzim ke dalam tabung uji dilakukan setelah penambahan 2 ml asam hidroklorida 1 M dan campur. Prosedur sama seperti langkah ke tujuh. Ukur pada panjang gelombang 620 nm dengan air sebagai blanko. Jika sampel hidrolisa sama rendah dengan blanko, lakukan uji ulang dengan menggunakan sedikit enzim.

Perhitungan:

$AU/\text{gram} = \text{mg kanji tercerna} / 30 \text{ menit} / (\text{gram enzim} \times d)$ untuk β -amilase, dan; $AU / \text{gram} \times 1000$

dimana:

$d = \text{faktor pengencer mg kanji tercerna} = [(ANH AH)/(ANH AB)] \times 24 \text{ mg kanji/ml} \times 5 \text{ ml}$

dimana:

ANH = nilai serapan sampel non hidrolisa.

AH = nilai serapan sampel hidrolisa.

AB = nilai serapan blanko.

24 mg kanji adalah konsentrasi larutan uji.

5 ml adalah jumlah larutan yang digunakan dalam larutan uji.

Untuk pengenceran digunakan sesuai dengan metode, untuk persamaan pengurangan digunakan :

$AU = 400 [(ANH AH)/(ANH AB)] / \text{gram enzim.}$

Protease**Prinsip**

Asam amino dan peptida terlarut, yang diproduksi dari hasil hidrolisa protease terhadap protein, dapat diukur nilai serapannya pada panjang gelombang 275 nm.

Aktivitas

Satu bahan aktif protease didefinisikan sebagai 1 μg L-Tirosin/menit/g enzim.

Kondisi

- Suhu : 37°C
- pH : 7,0
- Waktu reaksi : 30 menit

Peralatan

- Penangas air 37°C
- Spektrofotometer
- Vortex mixer
- Wrist action shaker
- Magnetik stirer

Pereaksi

- Kasein,
- Tris (hidroksimetil) aminometan, tris,
- Asam triklorasetat (TCA)
- Natrium asetat,
- Asam asetat glasial
- Larutan
- Catatan: toleransi pH adalah $\pm 0,05$.
- **Kasein substrat.** Dispersikan 7 g casein dalam 500 ml larutan 6,05 g (0,05 M) tris dan 8,0 ml asam hidroklorida 1 M, panaskan sampai mendekati titik didih selama 30 menit, dinginkan pada suhu kamar, atur pH 7,0 dengan asam hidroklorida 0,2 M (± 140 ml)]. Tambah air sampai batas volume 1000 ml.
- **Pelarut.** Larutkan 12,1 g tris dalam 500 ml air, tambah 90 ml asam hidroklorida 1 M. Atur pH 7,0 dengan asam hidroklorida 1 M atau NaOH 1 M.

- **TCA.** Larutkan 18,0 g TCA dan 19,0 g natrium asetat dalam 500 ml air, tambah 20 gram asam asetat glasial, dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml
- **Larutan uji.** Larutkan zat uji dengan pelarut.

Prosedur

Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan: Siapkan enzim kering, tambah 10 ml larutan kasein substrat ke dalam masing-masing zat uji dan blanko. Panaskan dalam penangas air dengan suhu 37°C selama 5 menit. Siapkan larutan enzim. Tambah 2 ml larutan enzim ke dalam zat uji, aduk selama 15 detik, kemudian selama 30 detik. Tambah 2 ml pelarut ke dalam blanko. Inkubasi selama 30 menit, tambah dengan 10 ml TCA. Aduk selama 15 detik dan panaskan dalam penangas air pada suhu 37°C selama 30 menit. Saring dan ukur serapan pada panjang gelombang 275 nm.

Perhitungan

Tiap nilai PU dihitung dari:

$$PU = \left[\frac{(\text{mcg L Tirosin/ml}) \times 22 \text{ ml} / 30 \text{ menit}}{(\text{g enzim} \times d)} \right]$$

dimana:

mcg adalah L Tirosin yang ditentukan dengan kurva kalibrasi.

22 ml adalah volume dalam campuran reaksi.

30 menit adalah waktu cerna.

d adalah larutan dalam enzim, 2 ml.

Pengenceran disesuaikan dengan metode, persamaan pengurangan untuk :

$$PU = 36,67 (\text{mcg L Tirosin}) / \text{menit} / \text{g enzim.}$$

Selulase

Prinsip

Enzim selulase menghidrolisis selulosa menjadi berat molekul yang rendah karena pengurangan karbohidrat.

Aktivitas

Satu unit selulase (CU) adalah jumlah enzim yang terbentuk dari pengurangan jumlah karbohidrat yang setara dengan 1 μmol glukosa/menit.

Kondisi

- Suhu : 40°C
- pH : 4,8
- Waktu reaksi: 20 menit

Alat

- Spektrofotometer
- Penangas air pada suhu 40°C dan 96°—100°C
- Vortex mixer
- Magnetik stirer

Pereaksi

- Karboksimetil selulosa, CMC 71Y
- Natrium asetat,
- Asam asetat glasial,

- Trinatrium fosfat
- Kalium besi sianida
- Fosfor pentoksida
- α -D-(+) Glukosa,
- Larutan
- Catatan: toleransi pH $\pm 0,05$ untuk semua larutan yang telah ditentukan.
- **Dapar asetat 0,1 M pH 4,8.** Larutkan 9,53 g natrium asetat anhidrat dalam 500 ml air, tambah 4,92 g asam asetat. Encerkan dengan air sampai batas volume 2000 ml. pH 4,80, simpan pada suhu 25°C (tahan 4 minggu).
- **CMC substrat 10 g/l.** Pada 800 ml dapar asetat 0,1 M pH 4,8, tambah 10 g CMC perlahan-lahan sambil di aduk. Panaskan pada suhu 80°—90°C sampai jernih, dinginkan dan encerkan dengan dapar asetat 0,1 M pH 4,8 sampai batas volume 1000 ml
- **Dapar fosfat 0,25 M pH 12,3.** Larutkan dan encerkan 95 g trinatrium fosfat dalam air sampai batas volume 1000 ml. Atur pH 12,3.
- **Kalium besi sianida pH 11,8.** Larutkan dan encerkan 1,6 g kalium besi sianida dan 14,0 g trinatrium fosfat dalam air sampai batas volume 500 ml. Atur pH 11,8.
- **Larutan glukosa 200 mg/l.** Larutkan dan encerkan 200 mg glukosa bebas air (oven 60°C dalam fosfor pentoksida selama 24 jam) dalam air sampai batas volume 1000 ml.
- **Larutan uji.** Larutkan zat uji dengan dapar asetat 0,1 M pH 4,8.
- **Sellulas.** Larutkan dan encerkan 0,030 g sellulas dalam dapar asetat sampai batas volume 100 ml.
- **Sellulase basa.** Larutkan 0,3 g sellulase dalam dapar asetat. Pada 10 ml larutan, encerkan dengan dapar asetat sampai batas volume 100 ml.

Prosedur

Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan: atur penangas air pada suhu 40°C dan penangas air kedua pada suhu 100°C. Masukkan CMC substrat ke dalam tabung erlenmeyer. Pada 3 ml, masukkan tabung erlenmeyer ke dalam penangas air pada suhu 100°C selama 10—15 menit untuk mencapai suhu reaksi. Pipet 1 ml larutan enzim ke dalam tabung uji, ulangi 2 kali. Tabung satu ditempatkan di atas penangas air pada suhu 40°C selama 5 menit. Pipet 1 ml air dalam tabung uji sebagai glukosa blanko. Pipet 2 ml kalium besi sianida pH 11,8 ke dalam zat uji dan glukosa blanko. Tambah 3 ml CMC substrat yang telah dihangatkan, aduk selama 15 detik, kemudian masukkan ke dalam penangas air. Setelah 30 detik, inkubasi selama 20 menit, tambah kalium besi sianida pH 11,8. Aduk selama 15 detik, tambah 2 ml larutan kalium besi sianida untuk masing-masing tabung, aduk selama 15 detik. Masukkan tabung uji ke dalam penangas air pada suhu 100°C selama 10 menit. Setelah 10 menit, dinginkan semua tabung pada suhu kamar selama 20 menit. Ukur pada panjang gelombang 420 nm dengan menggunakan air sebagai blanko.

Perhitungan

$$\text{CU/gram} = \frac{F(\text{GI}) \times (\text{B S}) \times 10001}{[\text{180,16} \times 20 \times (\text{gram/ml})]}$$

dimana:

B = nilai serapan sampel blanko

9 = nilai serapan sampel

1000 = konversi dari mg ke mcg

180,16 = berat molekul dari glukosa

20 = waktu inkubasi

$(\text{gram/ml}) = (\text{gram enzim}/100 \text{ ml}) \times (10 \text{ ml}/100 \text{ ml}) = \text{gr enzim}/1000$

F(GI) = faktor glukosa yang dihitung dari :

$F(\text{GI}) = (\text{mg glukosa}/L / (B' S'))$,

dimana

mg glukosa /L = ditentukan dengan pengukuran

B' = nilai serapan dari glukosa sampel

S' = nilai serapan dari larutan glukosa blank.

Untuk pelarut perhitungan residu adalah:

$$\text{CU/gram} (277,53 \times F(\text{GI}) \times (\text{B S}))/\text{gram enzim.}$$

Spesifikasi

- Selluslas : 1500 CU/gram
- Sellulase basa : 150 CU/gram
- Zat uji : 5 CU/gram

Pektinase**Prinsip**

Pada hidrolisis pektin, polisakarida terbentuk dari unit galaktosa, oleh enzim pektinase yang diikuti dengan reduksi kekentalan larutan pektin.

Aktivitas

Satu unit pektin (PCU) adalah jumlah enzim yang merubah kekentalan, $1/\text{nsp} = 0,000015$, dari larutan pektin.

Kondisi

- Suhu: 30°C
- pH: 3,7
- Waktu reaksi: 15 menit
- Kekentalan larutan pektin: 20 mpas

Peralatan

- Penangas air pada suhu 30°C
- Pengatur waktu
- Viskometer dengan kapiler II dan K = 0,1000, American Scientific Co. Cat. No. P2902 200

Pereaksi

- Pektin
- Asam sitrat
- Alkohol absolut
- Kalsium klorida dihidrat
- Larutan
- **Kalsium klorida 1 M.** Larutkan dan encerkan 73,51 g kalsium klorida dalam air sampai batas volume 1000 ml.

- **Kalsium klorida 0,02 M.** Encerkan 20 ml larutan kalsium klorida 1 M dengan air sampai batas volume 1000 ml .
- **Dapar sitrat pH 3,7.** Larutkan 2,10 g asam sitrat dalam 50 ml air bebas mineral, tambah 14,2 ml NaOH 1 M dan 10 ml kalsium klorida 1 M. Encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml. Atur pH 3,7.
- **Larutan pektin.** Larutkan 3 g pektin dalam 5 ml alkohol secara perlahan-lahan, tambah air 100 ml, aduk selama 30 menit, tambah 40 ml dapar sitrat pH 3,7, dan encerkan dengan air sampai batas volume 200 ml. Simpan pada suhu 4°C selama 16 jam, saring dengan Whatman GF/B.
- **Larutan uji.** Larutkan zat uji dalam 100 ml kalsium klorida 0,02 M.
- **Pektinase.** Larutkan 0,70 g pektinase dalam larutan kalsium klorida sampai batas volume 100 ml. Pada 2 ml, encerkan dengan kalsium klorida sampai batas volume 100 ml.
- **Pektinase basa.** Larutkan 1,50 g dalam 100 ml larutan kalsium klorida. Encerkan 2 ml larutan dengan larutan kalsium klorida sampai batas volume 100 ml.

Prosedur**(t) Inisial**

Pektin: Pada 15 ml larutan pektin yang telah dihangatkan selama 20 menit dalam penangas air pada suhu 30°C. Pada akhir pemanasan, tambah dengan 2 ml larutan kalsium klorida 0,02 M, aduk. Panaskan campuran tersebut dalam viskometer selama 5 menit untuk sistem penyeimbangan pada suhu 30°C kemudian diukur laju alir (t). Laju alir sekitar 160 detik.

(t') Uji

Pada 15 ml larutan pekin yang dihangatkan selama 20 menit dalam penangas air pada suhu 30°C. Pada akhir pemanasan, tambah dengan 2 ml larutan uji, aduk. Inkubasi selama 8 menit, dan pindahkan ke dalam viskometer. Pengukuran dilakukan selama 15 menit setelah penambahan larutan uji.

Perhitungan:

Aktifitas sediaan enzim diukur dengan:

$$\text{Unit/gram} = \frac{[(\text{dl}/\text{Nsp})/0,000015]}{E}$$

dimana:

E = Jumlah enzim (g) yang digunakan dalam sediaan larutan enzim.

$0,000015 = I/\text{Nsp}(t')$

$\text{Nsp} = \frac{[(\text{kekentalan larutan})/(\text{kekentalan air})]}{1}$

dimana:

kekentalan air adalah = 0,8007 cP

kekentalan larutan adalah = (laju alir dT) x K x D

dimana:

K= faktor kapiler untuk kapiler II=0,1000

D= kerapatan reaksi campuran=1,003

dT= Hagenbach Coutte koreksi untuk kapiler II

Perhitungan untuk viskositas larutan menjadi

$$N_{sp}(t) = [(t \times O, 1000 \times l, 003) / 0,8007] - 1 = 0,1253t - 1$$

untuk t'; $1/N_{sp}(t') = [(t' \times O, 1000 \times l, 003) / 0,8007] - 1 = 0,1253T' - 1$

$$dl/N_{sp} = fl / (0,1253t' - 1) \quad [l / (0,1253t - 1)]$$

Pengganti persamaan terakhir dalam persamaan perhitungan untuk hasil aktivitas adalah sebagai berikut:

$$\text{Unit/gram: } ([1 / (0,1253t' - 1)] - [1 / (0,1253t - 1)]) / 0,000015/E$$

Spesifikasi

- Pektinase 10.000 PCU/gram
- Pektinase basa 5.000 PCU/gram
- Zat uji 250 PCU/gram

β-Glukanase

Prinsip

Hidrolisis β-glukan oleh β-glukanase menghasilkan glukosa dan reduksi karbohidrat yang ditentukan dengan metode Somogyi-Nelson.

Aktivitas

Satu unit β-glukanase (BGU) adalah jumlah enzim yang terbentuk dari sejumlah reduksi karbohidrat setara dengan 1 μmol glukosa/menit.

Kondisi

- Suhu : 30°C
- pH : 7,5
- Waktu reaksi : 30 menit
- Konsentrasi substrat : 0,5 % β-glukan.

Peralatan

- Spektrofotometer
- Penangas air pada suhu 30°C
- Vorteks
- Pengaduk magnetik

Pereaksi

- β-glukan
- Glukosa
- Natrium fosfat dibasa trihidrat
- Kalium fosfat anhidrat
- Ammonium molibdat
- Asam sulfat
- Natrium arsenat heptahidrat
- Kalium natrium tartrat (*Rochelle salt*)
- Natrium hidroksida 1 M
- Tembaga sulfat
- Natrium sulfat anhidrat
- **Larutan β-glukan 1,0%.** Larutkan 250 mg β-glukan dalam 25 ml dapar sorenson 1/30 pH 7,5 diatas lempeng panas pada suhu 60°C sambil diaduk, dinginkan dan atur pH 7,5 (larutan harus segar).
- **Dapar Sorenson 1/30 pH 7,5.** Larutkan dan encer-

kan 7,61 g natrium fosfat heptahidrat dan 0,67 g kalium fosfat dalam air sampai batas volume 1000 ml (larutan tahan 1 bulan).

- **Pereaksi Nelson's.** Larutkan 50 g ammonium molibdat dalam 900 ml air, tambah 42 ml asam sulfat pekat, aduk. Tambah 6,0 g natrium arsenat heptahidrat dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml. Simpan pada suhu 37°C Selama 24—48 jam. Terbentuk arutan kuning (larutan tahan 14 hari).
- **Pereaksi Somogyi's.** Larutkan 52,84 g kalium fosfat dibasa heptahidrat dan 40,0 g kalium natrium tartrat tetrahidrat dalam 500 ml air, tambah 100 g natrium hidroksida 1 M, aduk. Tambah 8,0 g tembaga sulfat pentahidrat. Kemudian larutkan 180 g natrium sulfat anhidrat dalam larutan tersebut (larutan tahan 14 hari).
- **Larutan glukosa 1,5%.** Larutkan 1,50 g glukosa dengan air sampai batas volume 100 ml (larutan tahan 2 bulan).
- **Larutan glukosa 0,150 mg/ml.** Pindahkan 1,0 ml larutan glukosa yang sebelumnya dihangatkan ke dalam labu 100 ml, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml
- Larutan enzim
- **Keremiks.** Larutkan 0,20 g keremiks dalam air sampai batas volume 100 ml. Pipet 10 ml dan encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml.
- **Karebasa.** Larutkan 1,3 g karebasa dalam air sampai batas volume 100 ml, biarkan selama 5 menit. Encerkan 10 ml larutan dengan air sampai batas volume 100 ml.
- **Larutan uji.** Larutkan zat uji dalam air.

Prosedur

Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan: Pipet 1 ml β-glukan dalam tabung uji dan tempatkan dalam penangas air pada suhu 37°C selama 5 menit. Untuk enzim blanko ke dalam tabung uji tambah 1 ml dapar fosfat 0,33 M dan tempatkan dalam penangas air pada suhu 37°C selama 5 menit. Tambah 1 ml larutan enzim ke dalam tabung uji, aduk selama 15 detik dan tempatkan ke dalam penangas air pada suhu 37°C selama 30 menit.

Blanko: Pipet 1 ml β-glukan dan 1 ml air dalam tabung uji, aduk selama 15 detik. Pipet 2 ml larutan glukosa blanko: Pipet 2 ml air dalam tabung uji. Pada akhir inkubasi, tambah 2 ml larutan tembaga pada masing-masing tabung, termasuk blanko, glukosa 0,15 mg/ml, dan glukosa blanko. Tempatkan semua tabung dalam penangas air pada suhu 37°C selama 20 menit. Dinginkan pada suhu kamar. Tambah 2 ml pereaksi Nelson's. Aduk sampai larut. Tambah dengan 40 ml air, aduk selama 15 detik. Ukur serapan pada panjang gelombang 520 nm.

Perhitungan:

$$\text{BGU/gram} = (G \times V) / (0,180 \times w \times l \times 30)$$

dimana :

$G = (\text{mg glukosa/ml zat uji} - \text{mg glukosa/ml substrat}) / (\text{mg glukosa/ml zat uji standar} / (\text{abs glukosa} - \text{abs indikator air})) \times (\text{abs zat uji} - \text{abs enzim blanko} - \text{abs. substrat})$

$(\text{mg glukosa/ml substrat}) = [(\text{mg glukosa/ml} - 0,15 \text{ mg/ml}) / (\text{abs glukosa} - 0,15 \text{ mg/ml} - \text{abs indikator air})] \times \text{abs substrat}$

V = volume (ml) enzim terlarut.

180 = berat molekul glukosa

0,180 = 180/(1000 $\mu\text{mol/mol}$)

w = Berat zat uji (g)

1 = Volume larutan uji yang digunakan untuk analisis

30 = waktu reaksi (menit)

Spesifikasi

• Keremiks	300 BGU/gram
• Kerebasa	45 BGU/gram
• Zat uji	33 BGU/gram

Pululanase

Prinsip

Pululan adalah polimer D glukosa linear yang terdiri dari unit unit maltotriosil yang bergabung dengan ikatan α -1-6 glukosidik.

Aktivitas

Satu unit pululan (PLU) adalah jumlah enzim yang menghidrolisis pululan dan jumlah reduksi karbohidrat sama dengan 1 μmol glukosa/menit.

Kondisi

- Konsentrasi pululan : 0,2%
- Suhu : 40°C
- pH : 5,0
- Waktu reaksi: 30 menit

Peralatan

- Spektrofotometer
- Penangas air pada suhu 40°C dan 96°—100°C
- Vorteks
- Pengaduk magnetik

Pereaksi

- Pululan
- Asam sitrat
- Glukosa
- Natrium fosfat dibasa trihidrat
- Kalium natrium tartrat
- Tembaga sulfat
- Natrium sulfat anhidrat
- Amonium molibdat
- Asam sulfat
- Natrium arsenat heptahidrat
- Trestatin A dari Kemin Industri
- Larutan
- Dapar sitrat 0,05 M pH 5 ;
- Pululan substrat 0,4% b/b
- Pereaksi tembaga Semogyi's
- Pereaksi Nelson's

- Larutan stok glukosa
- Glukosa 0,15 mg/ml,
- Larutan trestatin A
- Larutan enzim: dekstrozim, deksbasa

Prosedur

Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan: Pipet 1 ml pululan dan tambah 50 μl larutan trestatin ke dalam tabung uji, volume tabung uji harus 10 ml. Letakkan tabung uji ke dalam penangas air pada suhu 40°C selama 5 menit. Tambah 1 ml larutan uji, aduk selama 15 detik, sumbat dan inkubasikan ke dalam penangas air pada suhu 40°C selama 30 menit.

Larutan blanko: Satu tabung uji yang mengandung 1 ml pululan, dibiarkan di dalam penangas air selama 30 menit sebelum penambahan dengan larutan uji. Pada akhir waktu inkubasi. tambah 2 ml pereaksi Somogyi's dan aduk selama 15 detik. Dinginkan pada suhu ruang. Tempatkan tabung uji pada penangas air pada suhu 100°C selama 20 menit.

Dinginkan tabung uji pada suhu ruang. Tambah dengan 2 ml pereaksi Nelson's collor. Aduk sampai larut. Tambah 2 ml air dan aduk selama 15 detik. Ukur serapan pada panjang gelombang 520 nm. Penentuan bidang miring (slope) :

$a = d (\text{abs})/d (\text{konsentrasi})$.

Slope dapat juga ditentukan dengan menggunakan analisa regresi linier.

Perhitungan:

$$\text{PLU/g} = [(\text{Abs zat uji} - \text{Abs blanko}) \times 2 \times 1.000.000 \times \text{VI} / [\text{a} \times 1000 \text{ g} \times 180 \times 30 \times 1,0]]$$

dimana :

2 = Volume campuran reaksi (ml)

180 = berat molekul glukosa

30 = waktu reaksi (menit)

a = bidang miring kurva glukosa;

g = berat zat uji (g);

V = Volume larutan uji, (V = 100 jika larutan uji dibuat sesuai dengan metode)

1,0 = Volume larutan pengaktif zat uji yang digunakan dalam reaksi (ml)

1.000.000 = faktor konversi dari μmol ke mol

1000 = konversi dari mililiter ke liter.

Spesifikasi

- Dekstrozim : 62,5 PLU/gram
- Deksbasa : 9,38 PLU/gram

Penetapan Hayati Antibiotik

Potensi antibiotik ditetapkan dengan membandingkan dosis sediaan uji terhadap dosis larutan standar yang masing-masing menghasilkan zona hambatan pertumbuhan yang sama pada biakan mikroba yang peka dan sesuai. Cara yang digunakan adalah cara lempeng atau cawan petri.

Potensi dihitung dengan rumus:

$$\log P = \frac{(UH + UL) - (SH + SL)}{(UH + SH) - (UL + SL)} \times \log 4$$

Keterangan:

P = potensi (dalam %)

SH = diameter standar kadar tinggi.

UH = diameter kadar sediaan kadar tinggi.

SL = diameter standar kadar rendah

UL = diameter sediaan kadar rendah

Untuk memperoleh SH (2—25 mm) dan SL (15—20 mm) dilakukan uji pendahuluan terhadap larutan

standar (kadar tinggi dan rendah) dengan mengatur kadar larutan mikroorganisme untuk lapisan atas sehingga diperoleh nilai tersebut.

Persiapan larutan uji

Lakukan prosedur pelarutan langsung dengan dapar fosfat yang sesuai atau bila perlu ekstraksi dengan dua jenis atau lebih pelarut yang berbeda. Jika perlu lakukan pengenceran sampai konsentrasi untuk uji.

Untuk standar tertentu (*), penimbangan dilakukan setelah dikeringkan terlebih dahulu pada kondisi vakum dengan suhu 60°C selama 3 jam.

Tabel 1. Jenis medium uji

Medium No.	pH	Komposisi	Jumlah (g/l)
1.	6,50 ± 0,1	Pepton	10,0 g
		Sari daging	5,0 g
		Natrium klorida	2,5 g
		Agar	15,0 g
2.	7,00 ± 0,1	Pepton	10,0 g
		Sari daging	5,0 g
		Natrium klorida	2,5 g
3.	8,00 ± 0,1	Pepton	5,0 g
		Sari daging	3,0 g
		Agar	15,0 g
4.	8,00 ± 0,1	Pepton	5,0 g
		Sari daging	5,0 g
		Dinatrium hidrogen fosfat	2,0 g
		Agar	15,0 g
5.	6,50± 0,1	Pepton	6,0 g
		Sari daging	1,5 g
		Sari ragi	3,0 g
		Glukosa	1,0 g
		Agar	15,0 g
6	8,00+0,1	Pepton	10,0 g
		Sari daging	5,0 g
		Natrium klorida	2,5 g
		Agar	15,0 g
7.	6,50 ± 0,1	Pepton	10,0 g
		Sari daging	5,0 g
		Natrium klorida	2,5 g
		Glukosa	5,0 g
		Agar	15,0 g
8	8,00 ± 0,1	Pepton	6,0 g
		Sari daging	1,5 g
		Sari ragi	3,0 g
		Glukosa	1,0 g
		Agar	15,0 g
9	7,30 ± 0,1	Natrium klorida	5,0 g
		Glukosa	2,5 g
		Pancreatic digest of casein	17,0 g
		Papak digest of say bean	3,0 g
		Kalium dihidrogen fosfat	2,5 g
		Agar	15,0 g
10	7,30± 0,1	Natrium klorida	5,0 g
		Glukosa	2,5 g
		Polisorbate 80	10,0 ml
		Pancreatic digest of casein	17,0 g
		Papak digest of say bean	3,0 g
		Kalium dihidrogen fosfat	2,5 g
		Agar	15,0 g
11	7,00 ± 0,1	Pepton	10,0 g
		Sari daging	10,0 g
		Natrium klorida	5,0 g
		Agar	15,0 g

Tabel 1. Jenis medium uji (lanjutan)

Medium No.	pH	Komposisi	Jumlah (g/l)
12.	7.00 ± 0,1	Pepton	5,0 g
		Glukosa	5,0 g
		Agar	15,0 g
13	7,30 ± 0,1	Pepton	3,75 g
		Natrium klorida	1,25 g
		Sari ragi	1,25 g
		Papak digest of liver	0,625 g
		Agar	15,0 g
14	6.00 ± 0,1	Pepton	5,0 g
		Sari daging	3,0 g
		Agar	15,0 g
15.	6,00 ± 0,1	Sari ragi	2,5 g
		Glukosa	10,0 g
		Kalium dihidrogen fosfat	0,45 g
		Dikalium hidrogen fosfat	0,64 g
		Agar	15,0 g
16.	8,00 ± 0,1	Pepton	10,0 g
		Sari ragi	5,0 g
		Natrium klorida	2,5 g
		Glukosa	5,0 g
		Agar	15,0 g
17.	6,0 ± 0,1	Papak digest of say meat	3,0 g
		Agar	18,0 g
18.	5,0 ± 0,1	Glukose anhydrous	10,0 g
		Sari ragi	2,5 g
		Magnesium sulphate	50,0 g
		Natrium klorida	70,0 g
		Agar	18,0 g
19.	6,0± 0,1	Dipotassium fosfat	0,69 g
		Monopotassium fosfat	0,45 g
		Sari ragi	2,5 g
		Glukose	10,0 g
		Agar	20,0 g
20	7,0 ± 0,1	Pepton	5,0 g
		Sari daging	3,0 g
		Sari ragi	2,0 g
		Agar	15,0 g
21	8,5 ± 0,1	Pepton	6,0 g
		Sari daging	1,5 g
		Sari ragi	3,0 g
		Glukose	1,0 g
		Agar	15,0 g
22	6,5 ± 0,1	Pepton	10,0 g
		Sari daging	3,0 g
		Natrium klorida	30,0 g
		Agar	15,0 g

Table 2. Larutan dapar

Dapar No.	pH	Komposisi	Jumlah (g/l)
1.	4,5 ± 0,1	Kalium dihidrogen fosfat	13,6 g
2.	6,0 ± 0,1	Kalium dihidrogen fosfat	3,5 g
		Dinatrium hidrogen fosfat	3,0 g
3.	6,0 ± 0,1	Kalium dihidrogen fosfat	7,0 g
		Dinatrium hidrogen fosfat	6,0 g
4.	8,0 ± 0,1	Kalium dihidrogen fosfat	13,3 g
		Kalium hidroksida	6,2 g
5.	6,0 ± 0,1	Kalium dihidrogen fosfat	40,0 g
		Dikalium hidrogen fosfat	10,0 g
6.	6,0 ± 0,1	Kalium dihidrogen fosfat	80,0 g
		Dikalium hidrogen fosfat	20,0 g
7.	8,0 ± 0,1	Kalium dihidrogen fosfat	13,3 g
		Natrium klorid	100,0 g
		Kalium hidroksid	6,2 g
8.	7,0 ± 0,1	Kalium dihidrogen fosfat	6,4 g
		Dinatrium hidrogen fosfat	18,9 g
9.	8,0 ± 0,1	Tris (hidroksi metil) aminometan	6,75 g
		Asam hidroklorid 0,1 M	300,0 mL
10.	6,0 ± 0,1 (1 %)	Dikalium hidrogen fosfat	2,0 g
		Kalium dihidrogen fosfat	8,0 g
11.	8,0 ± 0,1 (0,1 M)	Dikalium hidrogen fosfat	16,73 g
		Kalium dihidrogen fosfat	0,523 g
12.	7,0 ± 0,1 (0,05 M)	Tris-HCl	6,06 g
		HCl 1 M	40,0 mL

Tabel 3. Pengenceran standar antibiotik

Jenis standar	Pelarut	Larutan stok/ml	Pelarut Sampai konsentrasi uji
Avoparsin	Air	1000 µg	1
Avilamisin	Metanol +Aseton (1:9)	1000 µg	4
Ampisilin	Dapar No. 3	1000 µg	3
Amoksisilin	Dapar No. 10	1000 µg	10
Apramisin	Air	1000 µg	6
Basitrasin *)	Dapar No. 3	1000 unit	3
Dihidrosteptomisin*)	Dapar No. 2	1000 µg	4
Dikloksasilin	Dapar No. 10	1000 µg	3
Eritromisin	Metanol 10 % Dapar No. 4	1000 µg	4
Enramisin	Metanol +Air (1:9)	1000 µg	9
Flavomisin	Metanol	1000 µg	8
Fosfomisin	Dapar No. 12	1000 µg	12
Gentamisin	Dapar No. 11	1000 µg	11
Higomisin	Dapar No. 11	1000 µg	11
Josamisin	Metanol +Air (1:9)	1000 µg	Air
Kanamisin	Dapar No. 2	1000 µg	4
Kitasamisin	Air	1000 µg	4
Klortetrasiklin	Air	1000 µg	1
Kloksasilin	Dapar No. 3	1000 µg	3
Klindamisin	Air	1000 µg	8
Kolistin	Dapar No. 6	1000 µg	6
Lasalosid	Metanol	1000 µg	Metanol + Air (25:75)
Linkomisin	Dapar No. 8	1000 µg	8
Maduramisin	Metanol	1000 µg	3
Monensin	Metanol	1000 µg	Metanol +Air (1:9)
Neomisin	Dapar No. 4	1000 µg	4
Novobiosin	Metanol 10 % Dapar No. 11	1000 µg	11
Narasin	Metanol	1000 µg	Metanol +Air (1:1)
Oksitetrasiklin	Air	1000 µg	1
Penisilin	Dapar No. 3	1000 unit	3
Streptomisin	Dapar No. 2	1000 µg	4
Spiramisin	Dapar No. 4	1000 µg	4
Salinomisin	Matanol	1000 µg	Air
Senduramisin	Metanol	1000 µg	Metanol + Air (3:7)
Sefaleksin	Air	1000 µg	10
Seftiofur	Dapar No. 3	1000 µg	3
Sefoperazon*)	Dapar No. 10	1000 µg	10
Tetrasiklin	Air	1000 µg	1
Tilosin	Metanol 10 % Dapar No. 4	1000 µg	4
Tiamulin	Air	1000 µg	4
Tilmikosin	Metanol 10 % Dapar No. 4	1000 µg	4
Virginiamisin	Metanol +Air (1:1)	1000 µg	2

Tabel 4 Jenis antibiotik, kuman uji dan pengenceran sediaan

Jenis Antibiotik	Kuman Uji	Medium No.	Dapar No.	Kadar Larutan Akhir	
				Tinggi	Rendah
Avoparsin	B. subtilis 6633	17	1	4,0 µg	1,0 µg
Avilamisin	M. luteus 10240	1	4	20,0 µg	5,0 µg
Ampisilin	B. subtilis 6633	14	3	10,0 µg	2,50 µg
Amoksisilin	B. subtilis 6633	14	1 %	10,0 µg	2,50 µg
Apramisin	B. subtilis 6633	14	Air	10,0 µg	2,50 µg
		3			
Basitrasin	M. luteus 10240	1	3	2,0 unit	0,50 unit
Dihidrosteptomisin	B. subtilis 6633	3	4	8,0 µg	2,0 µg
Dikloksasilin	B. subtilis 6633	14	3	10,0 µg	2,50 µg
Doksisiklin	M. luteus 9341	5	1	20,0 µg	5,0 µg
	K. pneumonia 10031	5	1	20,0 µg	5,0 µg
	B. cereus 11778	21	1	20,0 µg	5,0 µg
Eritromisin	M. luteus 9341	8	4	2,0 µg	0,5 µg
	S. epidermidis 12228	8	4	2,0 µg	0,5 µg
Enramisin	B. subtilis 6633	4	9	40,0 µg	10,0 µg
Flavomisin	S. aureus 6538 P	3	8	6,0 µg	1,50 µg
Fosfomisin	Proteus sp	20	12	10,0 µg	2,50 µg
Gentamisin	S. epidermidis 12228	8	11	4,0 µg	1,0 µg
Higromisin	B. subtilis 6633	3	11	200,0 µg	50,0 µg
Josamisin	B. subtilis 6633	3	Air	30,0 µg	7,50 µg
Kanamisin	B. subtilis 6633	3	4	20,0 µg	5,0 µg
Kitasamisin	B. subtilis 6633	3	4	30,0 µg	7,50 µg
Klortetrasiklin	M. luteus 9341	5	1	40,0 µg	10,0 µg
Kloksasilin	B. subtilis 6633	14	3	20,0 µg	5,0 µg
Klindamisin	M. luteus 9341	5	8	2,0 µg	0,5 µg
Kolistin	E. coli NIHJ	22	6	40,0 µg	10,0 µg
			10		
Lasalosit	B. subtilis 6633	19	MeOH-Air 25:75	20,0 µg	5,0 µg
Linkomisin	M. luteus 9341	1	8	10,0 µg	2,5 µg
Maduramisin	B. subtilis 6633	14	3	100,0 µg	25,0 µg
Monensin	B. subtilis 6633	15	MeOH-Air 1:9	20,0 µg	5,0 µg
	S. epidermidis 12228	8	4	120,0 µg	30,0 µg
Neomisin	S. aureus 6538P	6	4	120,0 µg	30,0 µg
	M. luteus 9341	5	11	20,0 µg	5,0 µg
Novabiosin	M. luteus 9341	5	11	20,0 µg	5,0 µg
Narasin	B. subtilis 6633	14	MeOH-Air 1:1	100,0 µg	25,0 µg
Oksitetrasiklin	M. luteus 9341	5	1	40,0 µg	10,0 µg
	B. cereus 11778	21	1	40,0 µg	10,0 µg
Penisilin	S. aureus 6538P	1	3	2,0 unit	0,5 unit
Streptomisin	B. subtilis 6633	3	4	8,0 µg	2,0 µg
Spiramisin	B. subtilis 6633	3	4	40,0 µg	10,0 µg
Spektinomisin	K. pneumoniae 10031	8	4	200,0 µg	50,0 µg
Salinomisin	B. subtilis 6633	14	Air	40,0 µg	10,0 µg
Senduramisin	B. subtilis 6633	18	MeOH-Air 3:7	2,5 µg	1,25 µg
Sefaleksin	B. subtilis 6633	3	10	40 µg	10 µg
Seftiofur	S. aureus 6538 P	1	3	40,0 µg	10,0 µg
Sefoperazon	P. aeruginosae 10490	5	10	100,0 µg	2,5 µg
Tetrasiklin	M. luteus 9341	5	1	40,0 µg	10,0 µg
	K. pneumoniae 10031	5	1	40,0 µg	10,0 µg
Tilosin	M. luteus 9341	8	4	10,0 µg	2,5 µg
Tiamulin	S. aureus 6538 P	5	4	20,0 µg	5,0 µg
Tilmikosin	M. luteus 9341	8	4	10,0 µg	2,50 µg
Virginamisin	M. luteus 9341	5	2	2,0 µg	0,5 µg

Penetapan Kadar Air

Untuk bahan yang tidak dihaluskan atau tidak diserbukkan, siapkan 10 g zat uji, dengan memotong, membentuk serbuk sampai diperoleh dengan ketebalan 3 mm. Hindarkan penggunaan alat penyerbuk dengan kecepatan tinggi pada penyiapan zat uji dan harus dijaga agar tidak terjadi kehilangan air selama proses penyiapan contoh dan bagian yang diambil mewakili zat uji.

Titration Bebas Air

Metode I

Larutkan zat uji dalam asam asetat glasial (sebelumnya dinetralkan), jika perlu hangatkan dan dinginkan, atau buat larutan seperti yang ditentukan. Jika zat uji berupa garam asam klorida atau bromida, tambah 15 ml raksa (II) asetat. Titrasi dengan asam perklorat 0,1 M sampai perubahan warna indikator sesuai dengan nilai maksimum dE/dV (E adalah daya elektromotif dan V adalah volume penitar) dalam titrasi potensiometri. Jika suhu penitar pada saat penetapan (t_2) berbeda dengan suhu penitar pada saat pembakuan (t_1), mengalikan volume penitar yang diperlukan dengan $[1 + 0,0011(t_2 - t_1)]$ dan hitung penetapan dari volume terkoreksi. Titrasi potensiometri dapat dilakukan menggunakan elektroda kaca dan elektroda standar kalomel jenuh (pastikan tidak terjadi kebocoran dari larutan jembatan garam) atau gunakan elektroda kombinasi. Hubungan antara elektroda kalomel dan cairan titrasi harus mempunyai tahanan listrik cukup rendah dan perpindahan cairan dari sisi ke sisi lain harus sedikit mungkin. Pembacaan hasil pengukuran kurang dari nol dapat dihindari dengan sumber daya elektromotif stabil yang dipasang secara seri dengan sistem elektroda. Kestabilan dapat terjadi, jika sambungan antara potensiometer dan sistem elektroda tidak dibuat sesuai dengan petunjuk pabrik.

Metode II

Gunakan penitar, pelarut dan indikator seperti yang tertera pada monografi. Lindungi larutan, penitar dari karbon dioksida dan lembab dari udara selama penetapan. Larutkan zat uji dalam volume pelarut yang sesuai (yang sebelumnya telah dinetralkan), jika perlu hangatkan dan dinginkan. Titrasi sampai perubahan warna indikator sesuai dengan nilai maksimum dE/dV (E adalah daya elektromotif dan V adalah volume penitar) dalam titrasi potensiometri. Penitar dilakukan pembakuan menggunakan pelarut dan indikator yang sama seperti yang ditentukan zat tersebut. Titrasi potensiometri dapat dilakukan menggunakan elektroda kaca dan elektroda standar kalomel jenuh. Larutan kalium klorida jenuh dalam air diganti dengan larutan kalium klorida jenuh dalam metanol. Hubungan antara elektroda kalomel dan cairan titrasi harus mempunyai tahanan listrik cukup rendah dan perpindahan cairan dari satu sisi ke sisi lain harus sedikit mungkin. Pembacaan hasil pengukuran kurang dari nol dapat dihindari dengan sumber

daya elektromotif stabil yang dipasang secara seri dengan sistem elektroda. Kestabilan dapat terjadi, jika sambungan antara potensiometer dan sistem elektroda tidak dibuat sesuai dengan petunjuk pabrik.

Penetapan Susut Pengerinan

Susut pengeringan adalah kadar bagian zat yang menguap, kecuali dinyatakan lain, penetapan dilakukan sebagai berikut :

Timbang 1—2 g zat uji dalam botol timbang yang kering dan telah ditara. Jika zat uji berupa serbuk besar, gerus dengan cepat sampai ukuran butiran lebih kurang 2 mm dan timbang. Ratakan zat uji dalam botol timbang sampai lapisan setebal lebih kurang 5—10 mm, panaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Masukkan botol ke dalam desikator, biarkan dingin. Jika suhu lebur zat uji lebih rendah dari suhu penetapan, maka pengeringan dilakukan dengan suhu 5°—10°C di bawah suhu leburnya selama 1—2 jam, kemudian lanjutkan pengeringan pada suhu 105°C sampai bobot tetap.

Pereaksi

Pereaksi yang digunakan adalah pereaksi yang umumnya tersedia secara komersial, dengan spesifikasi yang sesuai dengan peruntukannya, seperti:

- Pro analisis,
- spektrofotometer dan
- spesifikasi kromatografi cair.

Pembuatan pereaksi menggunakan air suling atau bebas mineral, kecuali dinyatakan lain.

Pereaksi dan bahan medium yang umum digunakan adalah :

Amonia (27%—30%), NH_3

Amonia encer (10%). Encerkan 375 ml amonia dengan air sampai batas volume 1000 ml.

Amonia-etanol. Encerkan amonia pekat dengan etanol (95%) sampai mengandung 85,16 g/l NH_3 (5 M).

Amonium asetat $\text{CH}_3\text{COO}_2\text{NH}_4$

Amonium asetat larutan (7,7% b/v) (1 M).

Amonium fosfat, amonium fosfat dibasa, diamonium hidrogenfosfat, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Amonium fosfat larutan, larutan amonium fosfat dibasa. Larutkan 13 g amonium fosfat dalam air sampai batas volume 100,0 ml.

Amonium karbonat Campuran amonium bikarbonat (NH_4HCO_3) dan amonium karbamat ($\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$) dengan perbandingan tidak tetap. Mengandung tidak kurang dari 30,0% NH_3 .

Amonium karbonat larutan. Larutan 5 g amonium karbonat dalam campuran 7,5 ml amonia encer dan 50 ml air, tambah air sampai batas volume 100,0 ml dan saring.

Amonium klorida

Amonium klorida larutan (10,0% b/v).

Amonium klorida amonia pekat larutan. Larutkan 67,5 g amonium klorida dalam 650 amonia, tambahkan air sampai batas volume 1000 ml.

Amonium klorida (Nessler) larutan. Campur 10 ml larutan amonium klorida dengan air bebas amonia sampai batas volume 1000 ml.

Amonium klorida encer (Nessler) larutan. Campur 10 ml larutan amonium klorida (Nessler) dengan air bebas amonia sampai batas volume 1000 ml.

Amonium molibdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Amonium molibat larutan (10,0% b/v).

Amonium molibat asam sulfat larutan. Larutkan 10 amonium molibat dalam air sampai batas volume 100 ml, tambah larutan perlahan lahan pada campuran 150 ml asam sulfat dengan 100 ml air.

Amonium oksalat $(\text{CO}_2\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{O}$

Amonium oksalat larutan (2,5% b/v)

Amonium persulfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ **Amonium sulfamat $\text{NH}_4\text{OSO}_2\text{NH}_2$** **Amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

Amonia sulfida larutan. Jenuhkan 120 ml amonia encer dengan hidrogen sulfida, tambah 80 ml amonium encer. Larutan harus segar.

Amonium tiosianat NH_4SCN

Amonium tiosianat larutan (10,0 % b/v).

Amonium tiosianat kobalt nitrat larutan. Larutkan 37,5 g kobalt (II) nitrat dan 150 g amonium tiosinat dalam air sampai batas volume 100 ml.

Amonium raksa (II) tiosianat larutan. Larutkan 30 g amonium tiosianat dan 27 g raksa (II) klorida dalam air sampai batas volume 1000 ml.

Anilin C_6HN **Anisaldehyd, 4 metoksibenzaldehid, $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{CHO}$**

Anisaldehyd larutan. Campuran yang terdiri dari 0,5 ml anisaldehyd, 10 ml asam asetat glasial, 85 ml metanol dan 5 ml asam sulfat.

Arang aktif, arang jerap

Daya menghilangkan warna. Tambah 100 mg pada 50 ml biru bromfenol 20% b/v dalam labu 250 ml, aduk. Biarkan selama 5 menit, saring. Warna hasil saringan tidak lebih tua dari warna larutan yang dibuat dengan mengencerkan 1 ml biru bromfenol 20% b/v dengan etanol (20 %) sampai batas volume 50,0 ml.

Arang aktif bebas klorida, arang jerap bebas klorida. Arang aktif yang memenuhi syarat tambahan berikut: klorida 1,0 g memenuhi uji batas klorida.

Arsentrioksida As_2O_3

Arsen (III) sulfida 500,0 mg larutan dalam 10 ml

amonia encer. Larutan tidak berwarna dan jernih, jika diencerkan dengan air volume sama dan diasamkan dengan asam hidroklorida. Tidak terbentuk warna kuning.

Asam asetat anhidrida, anhidrida asetat $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$

Asam asetat encer (5—10%)

Asam asetat glasial**Asam askorbat****Asam borat****Asam folat****Asam format HCO_2H**

Asam fosfat. Mengandung tidak kurang dari 85% H_3PO_4 .

Asam fosfat encer. Larutkan dan encerkan 112 g asam fosfat dengan air sampai batas volume 1000 ml.

Asam fosfomolibdat $\text{H}_3\text{PO}_4\cdot 12\text{MoO}_{32}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Asam fosfomolibdat sulfat larutan (fosfotungstat). Larutkan 25 g natrium wolframat dalam 175 ml air, tambahkan 18,75 ml asam fosfat. Panaskan memakai refluks kondensor selama 6 jam, saring, tambah air sampai batas volume 250,0 ml. Simpan pada suhu 2°—10°C dan terlindung dari cahaya.

Asam hidroklorida

Asam hidriklorida-brom. Pada 1 ml brom, tambah asam hidroklorida sampai batas volume 100 ml.

Asam hidroklorida encer. Mengandung asam hidroklorida 7,3% b/v (2 M).

Asam hidroklorida (10% v/v). Campur 236 ml asam hidroklorida dengan air sampai batas volume 1000 ml.

Asam kromotropat larutan. Larutkan 5 mg natrium kromotropat dalam 10 ml campuran 9 ml asam sulfat dan 4 ml air.

Asam metafosfat HPO_3 . Tercampur dengan natrium metafosfat.

Asam nikotinat

Asam nitrat HNO_3 . Mengandung tidak kurang dari 69,0% dan tidak lebih dari 71,0% HNO_3 .

Asam nitrat encer. Campur 106 ml asam nitrat dengan air sampai batas volume 1000 ml (10% NHO_3).

Asam oksalat $(\text{CO}_2\text{H})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Asam oksalat larutan (6,3% b/v).

Asam perklorat $\text{HIO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Mengandung tidak kurang dari 98,0%

Asam perklorat (20%). Larutan dalam air yang mengandung 20% HClO_4 (2N).

Asam perklorat (60%). Larutan asam perklorat dalam air. Mengandung tidak kurang dari 59,0% HIO_4 .

Asam perklorat (70%). Larutan dalam air yang mengandung tidak kurang dari 70,0% HClO_4 .

Asam salisilat**Asam sitrat monohidrat****Asam sulfanilat $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$**

Mengandung tidak kurang dari 99,0% $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$

Asam sulfanilat naftilamin larutan. Larutkan 500 mg asam sulfanilat dalam 150 ml asam asetat. Larutkan 100 mg naftamina hidroklorida dalam 150 ml asam asetat. Campur kedua larutan. Terbentuk warna merah muda yang akan hilang oleh serbuk seng.

Asam sulfat

Asam sulfat (10% v/v). Campur 1 volume asam sulfat dengan 8 volume air, dinginkan.

Asam sulfat (20% v/v). Campur 1 volume asam sulfat dengan 4 volume air, dinginkan.

Asam sulfat bebas klorida. Asam sulfat yang memenuhi syarat berikut: Campur 2 ml dengan 50 ml air, tambahkan 1 ml larutan perak nitrat, tidak terjadi opalesensi.

Asam sulfat bebas nitrogen. Asam sulfat yang memenuhi syarat sebagai berikut: Campur 45 ml dengan 5 ml air, dinginkan, tambah 8 mg difenilbenzidin. Larutan tetap tidak berwarna atau hanya berwarna biru pucat.

Asam sulfat encer. Larutkan dan encerkan 104 g asam sulfat dengan air sampai batas volume 1000 ml dan dinginkan.

Asam sulfat-etanol 0,3% v/v. Campur 1 volume asam sulfat-etanol encer dengan 2 volume air.

Asam sulfat-etanol encer. Dinginkan secara terpisah 20 ml etanol (95%) dan 80 ml asam sulfat sampai suhu -5°C . Tambah dengan hati-hati asam sulfat pada etanol, dinginkan, aduk perlahan lahan. Larutan harus disimpan di tempat dingin.

Asam tartat $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$. Mengandung tidak kurang dari 99,0% $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$, dihitung terhadap zat kering

Asam tartrat larutan (1,0 % b/v).

Asam tioglikolat, asam merkptoasetat, $\text{Hg}\cdot\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$. Mengandung tidak kurang dari 89,0% $\text{Hg}\cdot\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$

Asam triklorasetat $\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}$. Mengandung tidak kurang dari 98,0%

Asetaminofen

Asetaminofen bebas, p aminofenol. Kristalkan asetaminofen dengan air sampai memenuhi syarat berikut: Larutkan dan encerkan 5 g zat kering dalam campuran metanol dan air dengan volume yang sama sampai batas volume 100 ml. Tambah 1,0 ml larutan natrium nitropruida basa, aduk dan biarkan selama 30 menit. Tidak terbentuk warna biru atau hijau.

Aseton $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ **Aseton absolut****Asetonitril, metilsianida, CH_3CN** **Barium hidroksida $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$**

Barium hidroksida larutan. 3,2% b/v dalam air bebas oksigen. Larutan harus segar.

Barium klorida $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Mengandung tidak kurang dari 98,5% $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Barium klorida larutan. (12,0% b/v).

Benzen C_6H_6 **Besi (III) amonium sitrat**

Mengandung tidak kurang dari 16,5% dan tidak lebih dari 18,5% Fe.

Besi (II) amonium sulfat

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Besi (III) amonium sulfat

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

Besi (III) amonium sulfat larutan. (8.0 % b/v) (0,5 N).

Besi (III) amonium sulfat asam larutan. Larutkan 200 mg besi (III) amonium sulfat dalam 50 ml air, tambah 6 ml asam nitrat encer dan encerkan dengan air sampai batas volume 100,0 ml.

Besi (II) sulfat anhidrat**Besi (II) sulfat larutan**

Larutkan besi (II) sulfat 2,8% b/v dalam air bebas oksigen (0,2 M). Larutan harus segar.

Besi (II) tiosianat larutan. Pada 35 ml air, tambah 3 ml asam sulfat encer, didihkan untuk menghilangkan oksigen. Pada larutan panas, tambah 1 g besi (II) sulfat, dinginkan dan tambah 500 mg kalium tiosianat. Tambah besi tereduksi sampai warna merah muda hilang. Larutan harus disimpan dalam wadah bebas oksigen dan jika berwarna merah muda, tidak boleh digunakan.

Biotin $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$. Mengandung tidak kurang dari 97,5% $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$.

2,2' Bpiridin (1,1' dipiridil), $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$ **Biru bromfenol, 3', 3'', 5', 5'' tetrabromo fenolsulfonaftalein, $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$**

Biru bromfenol larutan. Hangatkan 100 mg biru bromfenol dengan 3,0 ml natrium hidroksida 0,05 M dan 5 ml etanol (95%), aduk. Tambah etanol (20%) sampai batas volume 250,0 ml.

Biru bromtimol, 6,6' (3H-2,1-benzoksatiol-3-iliden) bis-(2-bromtimol) SS dioksida; dibromtimol sulfoftalein, $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$

Biru bromtimol larutan. Hangatkan 100 mg biru bromtimol dengan 3,2 ml natrium hidroksida 0,05 M dan 5 ml etanol (90%). Setelah larut sempurna, tambah etanol (20%) sampai batas volume 250,0 ml.

Biru hidroksinaftol. Natrium 1-(2-naftalazo-3,6-disulfonat)-2-naftol-4-sulfonat, $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}_3$. Diendapkan pada serbuk natrium klorida.

Biru metilen, kuning metil, metiltionina klorida

Biru metilen, kuning metil larutan. Larutkan 125 mg biru metilen dalam 100 ml etanol (95%) dan encerkan dengan air sampai batas volume 250,0 ml.

Biru metilitimol. 3,3' bis NN[di(karboksimetil)aminometil] timol sulfonftalein,

Biru metiltimol campuran. Campur 1 volume biru metilitimol dan 100 volume kalium nitrat.

Biru tetrazolium. [3,3'-(3-3'-dimetoksi-4,4' bifenilena)-bis(2,5-difenil-2 H-tetrazolium klorida)]

Biru tetrazolium basa larutan. Campur 1 volume biru tetrazolium 0,2% b/v dalam metanol dengan 3 volume natrium hidroksida 12% b/v dalam metanol.

Biru timol, timol sulfonftatein, C₂₇H₃₀O₅S. Hangatkan 100 mg biru timol dengan 4,3 ml natrium hidroksida 0,05 M dan 5 ml etanol (90%). jika telah larut, tambah etanol (20%) sampai batas volume 250,0 ml.

Brom Br₂. Cairan coklat kemerahan, berasap, korosif. Sukar larut dalam air, larut dalam pelarut organik.

n Butanol, butanol; butan 1 ol**Butil hidroksitoluen****Dietilamin (C₂H₅)₂ NH****2,7 Diklorfluorosein**

Diklorfluorosein larutan. Larutkan 100 mg diklorofluorosein dalam 60 ml etanol (95%), tambah 2,5 ml natrium hidroksida 0,1 M, aduk dan encerkan dengan air sampai batas volume 100,0 ml.

Diklormetan, metilenklorida CH₂Cl₂**Dimetilaminobenzaldehid, p dimetilaminobenzaldehid**

Dimetilaminobenzaldehid larutan. Larutkan 125 mg dimetilaminobenzaldehid dalam campuran 65 ml asam sulfat dingin dan 35 ml air, tambah 0,1 ml larutan besi (II) klorida. Larutan dibiarkan selama 24 jam sebelum digunakan. Jika berwarna kuning tidak boleh digunakan.

Dimetilanilin, N,N dimetilanilin**Dimetilformamid****Dimetilglioksim, diasetil dioksim****Dimetilsulfoksida****Dinitrobenzen, 3 dinitrobenzen**

Dinitrobenzen larutan. (1% b/v) dalam etanol (95%).

Dinitrofenilhidrazin, 2,4 dinitrofenilhidrazin

Dinitrofenilhidrazin larutan. Larutkan 1,5 g dinitrofenilhidrazina dalam 20 ml asam sulfat (50% v/v).

Dioksan**Ditizon, 1,5 difeniltiokarbazon**

Ditizon larutan. (0,05% b/v dalam kloroform).

n Dotriakontan**Etanol absolut****Eter, dietil eter****Petroleum benzin (40°—60°C)****Etil asetat****Etilen klorida****Etilmetilketon, 2 butanon****Fenantrolin, 1, 10 fenantrolin,**

Fenantrolin larutan, feroin sulfat larutan. Larutkan 700 mg besi (II) sulfat dalam 70 ml air, tambah 1,5 mg o fenantrolin dan dengan air sampai batas volume 100 ml.

Fenilhidrazin

Fenilhidrazin larutan. Larutkan 65 ml serbuk fenilhidrazin hidroklorida dalam campuran 170 ml asam sulfat dan 80 ml air. Encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml.

Fenilhidrazin hidroklorida**Fenol****Fenolftalein**

Fenolftalein larutan. Larutkan 200 mg fenolftalein dalam 60 ml etanol (90%) dan encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml.

Fluorosein natrium**Formaldehid larutan****Gliserol****Glukosa****Glukosa bebas air****Heksamin****Heksan****Helium, He****Heptan****Hidrogen peroksida**

Hidrogen peroksida encer. Larutan hidrogen peroksida 6% b/v yang memenuhi syarat berikut: Pada 10 ml larutan, tambah 40 ml air, 1 ml asam nitrat encer dan 1 ml larutan perak nitrat. Tidak terjadi opalesensi.

Hidroksimilamin hidroklorida, hidroksilamonium klorida

Hidroksimilamin hidroklorida larutan. Larutkan

1 g hidroksilamina hidroklorida dalam 50 ml air dan tambah 50 ml etanol (95%), 1 ml larutan biru bromfenol dan natrium hidroksida 0,1 M sampai terbentuk warna hijau.

Hidroksilamin etanol (60%). Larutkan 34,75 g hidroksilamin hidroklorida dalam 950 ml etanol (95%), tambah 5 ml metil orange 0,2% b/v dalam etanol (60%) dan kalium hidroksida 0,5 M dalam etanol (60%) sampai terbentuk warna kuning. Encerkan dengan etanol (60%) sampai batas volume 100 ml.

Hijau bromkresol

Tetrabrom m kresolsulfonftalein

Hijau bromkresol larutan. Hangatkan 100 mg hijau bromkresol dengan 2,9 ml natrium hidroksida 0,05 M dan 5 ml etanol (90%), setelah larut sempurna, tambah etanol (20%) sampai batas volume 250 ml.

D,L Histidin monohidroklorida

Hitam eriokrom, hitam mordan

Hitam eriokrom campuran. Campur 0,2 volume larutan eriokrom dengan 100 volume natrium klorida. Larutan harus segar.

Hitam eriokrom larutan. Larutkan dan encerkan 200 mg hitam eriokrom dan 2 g hidroksilamin hidroklorida dalam metanol sampai batas volume 50 ml.

Iodium, iodin

Iodium larutan. Larutkan dan encerkan 2 g iodium dan 3 g kalium iodida dalam air sampai batas volume 100 ml.

Iso oktan, trimetilpentan, 2,2,4-trimetilpentan

Isopropanol, iso propileter, propan 2 ol

Metil jingga, natrium 4 dimetilaminoazobenzen-4 sulfonat,

Metil jingga larutan (0,04% b/v) dalam etanol (20%).

Silenol jingga

Silenol jingga larutan. campuran. Kocok 100 mg silenol jingga dengan 100 ml air, dan saring.

Kalium bikarbonat, kalium hidrogen karbonat,

Kalium dikromat $K_2Cr_2O_7$

Kalium dikromat larutan (7,0% b/v)

Kalium disulfat, kalium hidrogen sulfat

Kalium bisulfat

Kalium bromat

Kalium bromida

Kalium heksasianoferat (II) $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$

Kalium heksasianoferat (II) larutan

Kalium heksasianoferat (II) larutan (5,05% b/v)

Kalium hidroksida, KOH

Kalium hidroksida larutan (11,2% KOH)

Kalium hidroksida-etanol larutan. Larutan kalium hidroksida 10,0% b/v dalam etanol (95%).

Kalium hidroksida-metanol larutan. Larutan 3 g kalium hidroksida dalam metanol (90%). Larutan harus segar.

Kalium iodat KIO_3 (1,0% b/v dalam air).

Kalium iodida

Kalium iodida larutan (16,5% b/v).

Kalium iodida kanji larutan. Larutkan dan encerkan 10 g kalium iodida dalam air sampai volume 95 ml, tambah 5 ml larutan kanji. Larutan harus segar.

Kalium karbonat anhidrat

Kalium klorida

Kalium kromat, K_2CrO_4

Kalium kromat larutan (5,0% b/v)

Kalium natrium tartrat

Kalium nitrat KNO_3

Kalium nitrit KNO_2 ,

Kalium oksalat

Kalium periodat, KIO_4

Kalium permanganat

Kalium permanganat larutan (1,0% b/v)

Kalium sianida, KCN

Kalium sianida larutan (10,0% b/v).

Kalium sitrat

Kalium sulfat, K_2SO_4

Kalium sulfat larutan (1,0% b/v).

Kalium tetrafenilborat

Kalium tiosianat, KCNS

Kalkon,

Kalkon campuran Campur 100 mg kalkon dengan 10 g natrium sulfat anhidrat.

Kalsium karbonat

Kalsium klorida anhidrat, $CaCl_2$

Kalsium klorida larutan (10% b/v).

Kasein

Klorkresol

Kloroform

Kristal violet

Kristal violet larutan (0,2% b/v dalam asam asetat glasial).

Lakmus kertas

Kertas lakmus merah atau kertas lakmus biru.

Lantanum nitrat

Lantanum nitrat larutan (5,0% b/v)

Ungu katekol, katekol sulfonftalein,**Lisin 2,6 asam diaminoheksanoat****Magnesium klorida****Magnesium oksida MgO****Magnesium sulfat**

Magnesium sulfat larutan (10% b/v).

Mangan (IV) oksida, mangan dioksida MnO₂,**Mangan sulfat****Merah kresol,****Merah metil**

Merah metil larutan. Hangatkan 25 mg merah metil dengan 0,95 ml natrium hidroksida 0,05 M dan tambah 5 ml etanol (95%). Setelah larut sempurna, tambah etanol (50%) sampai batas volume 250 ml.

Merah metil, biru metilen larutan, metil violet larutan. Campur 20 ml merah metil 0,05% b/v dalam etanol (80%) dengan 0,4 ml biru metilen 2,0% b/v.

Metanol**Metanol absolut, metanol anhidrat****1-Naftilamin,****1-Naftol, α-naftol.**

1-Naftol larutan. Larutkan 1 g α-naftol dalam larutan (mengandung 6 g natrium hidroksida dengan 16 g natrium karbonat anhidrat dalam 100 ml air). Larutan harus segar.

2-Naftol, β-naftol,

2-Naftol larutan. Larutkan 5 g 2 naftol (yang baru dihablurkan kembali) dalam 8 ml larutan natrium hidroksida dan tambah air sampai batas volume 100 ml. Larutan harus segar.

p-Naftolbenzin

Naftolbenzin larutan (0,25% b/v dalam asam asetat glasial).

1 Naftolftalein 1,3 naftalendiol**Natrium asetat**

Natrium asetat larutan (13,6% b/v) (1 M).

Natrium bisulfit

Natrium bisulfit larutan. Larutkan dan encerkan 10 g natrium bisulfit dalam air sampai batas volume 30 ml. Larutan harus segar.

Natrium dihidrogenfosfat,**Natrium difosfat,****Natrium fosfat mono basa****Natrium dietilditiokarbamat**

Natrium dietilditiokarbamat larutan (0,1 % b/v).

Dinatrium hidrogenfosfat,**Natrium fosfomolibdat,****Trinatrium dodekamolibdatfosfat****Natrium hidrogen selenit****Natrium hidroksida**

Natrium hidroksida larutan (20,0% b/v).

Natrium hidroksida encer (4,0% b/v).

Natrium hidroksida metanol (0,04%). Larutkan 1 volume natrium hidroksida dalam 2500 volume metanol.

Natrium karbonat

Natrium karbonat larutan (10% b/v).

Natrium klorida

Natrium klorida larutan injeksi (0,9% b/v yang steril).

Natrium molibdat**Natrium nitrit NaNO₂**

Natrium nitrit larutan (10,0% b/v).

Natrium periodat, natrium metaperiodat, NaIO₄**Natrium sitrat****Natrium sulfat anhidrat****Natrium sulfit Na₂SO₃·7H₂O**

Mengandung tidak kurang dari 96,0% Na₂SO₃·7H₂O.

Natrium tartrat, natrium tartrat dihidrat,**Natrium tetrabonat, boraks, natrium tetrabonat,****Natrium tetrafenilborat.****Natrium tiosulfat****Ninhidrin**

Ninhidrin larutan (0,2% b/v).

p-Nitroanilin, 4-nitroanilin

p-Nitroanilin diazotasi larutan, 4-nitroanilin larutan. Larutkan 400 mg 4 nitroanilin dalam 60 ml asam hidroklorida 1 M, dinginkan sampai suhu 15°C, tambah natrium nitrit 10% b/v sampai 1 tetes

campuran merubah kertas kanji iodida menjadi warna biru. Larutan harus segar.

Nitrobenzen

Pati kentang (kanji)

Pati (kanji) larutan. Pati yang telah direaksikan dengan asam hidroklorida. Setelah dibilas dan dilarutkan dalam air panas, larutan hampir jernih.

Penisilinase (Tetapan Michaelis penisilinase untuk benzilpenisilin 12 µg/ml).

Pepton

Perak nitrat

Perak nitrat larutan (5,0% b/v larutan harus segar).

Piridin

Piridoksamin dihidroklorida

Pirogalol, 1,2,3 Trihidroksibenzen,

Prokain

n Propanol, propan 1 ol,

Propilenglikol

Raksa (II) klorida

Raksa (II) klorida larutan (6,5% b/v).

Reserpin

Resorsinol

Serium (IV) amonium nitrat

Serium (IV) amonium nitrat larutan. Larutkan 6,25g serium (IV) amonium nitrat dalam 10 ml asam nitrat 0,235 M. Larutan harus segar.

Serium (IV) amonium sulfat

Setrimid

Setalkonium klorida

Benzilheksadekildimetil amonium klorida,

Sikloheksan

Silika gel

Silika gel G

Silika gel GF₂₅₄

Silika gel H

Sistein, L sistein

Tanah fuller

Terdiri dari aluminium magnesium silikat hidrat.

Tembaga (II) sulfat

Tembaga (II) sulfat larutan (10,0% b/v).

Tembaga (II) sulfat encer. Larutkan 15,22 g natrium hidrogenfosfat anhidrat dalam air sampai volume 536 ml, atur pH 5,15 – 5,25 dengan asam sitrat 2,1 % b/v (646 ml). Campur 999 ml larutan dengan 1 ml larutan tembaga (II) sulfat dalam 90 ml air, tambah 30 ml piridin. Larutan harus segar.

Tetrabutylamonium iodida

Tetrahidrofur

Tetrametilamonium hidroksida

Tetrametilamonium hidroksida larutan encer, Encerkan 4 ml tetrametilamonium hidroksida dengan etanol absolut bebas aldehid sampai batas volume 100,0 ml. Larutan harus segar.

Timbal (II) asetat

Timbal (II) asetat larutan (9,5% b/v dalam air bebas karbondioksida).

Timerosal, tiomersal

Timolftalein

Timolftalein larutan. Larutkan 200 mg timolftalein dalam 60 ml etanol (90%), tambah air sampai batas volume 100,0 ml.

Toluen

Trifeniltetrazolium klorida

Trifeniltetrazolium klorida larutan. (0,5% b/v dalam etanol absolut bebas aldehid). Larutan harus segar.

Trinitrofenol, asam pikrat. Serbuk kristal kuning terang. Mudah meledak.

Trinitrofenol larutan, asam pikrat larutan. Pada 100 ml larutan trinitrofenol jenuh dalam air, tambah 0,5 ml larutan natrium hidroksida encer.

Triptofan, L triptofan

D,L triptofan,

Bromkresol violet

Bromkresol violet larutan. Hangatkan 100 mg bromkresol violet dengan 5 ml etanol (90%) sampai larut, tambah 100 ml etanol (20%), 3,7 ml natrium hidroksida 0,05 M dan etanol (20%) sampai batas volume 250 ml.

Vanilin

Xantin

Reaksi Identifikasi

Aluminium

Pada larutan garam aluminium, tambah larutan amonium klorida dan amonia encer. Terbentuk endapan gel putih, yang larut dalam asam hidroklorida, asam asetat atau larutan natrium hidroksida, tetapi hampir tidak larut dalam amonia encer, larutan garam

amonium dan praktis tidak larut dalam semua pelarut di atas, jika campuran dididihkan.

Pada larutan garam aluminium, tambah amonia encer sampai terbentuk endapan halus, kemudian tambah 5 tetes larutan segar kinalizurin 0,05% b/v dalam larutan natrium hidroksida 1% b/v, panaskan sampai mendidih. Dinginkan, asamkan dengan asam asetat berlebih, terbentuk warna violet kemerahan.

Pada larutan garam aluminium, tambah 5 tetes larutan amonium asetat atau 5 tetes larutan biru mordan III (0,1 % b/v), terbentuk warna ungu kuat.

Amina aromatik primer

Larutkan 100 mg dalam 2 ml asam hidroklorida encer, jika perlu panaskan, dinginkan dalam es, tambah 4 ml natrium nitrit (1% b/v), tambah 2 ml larutan naftol yang mengandung 1 g natrium asetat, terbentuk endapan kuning tua—merah tua tergantung dari zat uji.

Amonium

Jika garam amonium dipanaskan dengan larutan natrium hidroksida, terbentuk amoniak, kertas lakmus merah menjadi biru.

Pada larutan garam amonium yang telah diasamkan dengan asam hidroklorida, tambah larutan platina (IV) klorida, jika ada etanol terbentuk serbuk kuning. Jika serbuk dipijarkan, residu hanya terdiri dari platina.

Antimon

Larutan senyawa antimon yang agak asam, tambah hidrogen sulfat, terbentuk endapan orange. Larut dalam larutan natrium hidroksida, larutan amonium sulfida dan asam hidroklorida hangat dengan membebaskan hidrogen sulfida. Tidak larut dalam larutan amonium karbonat.

Pada larutan senyawa antimon, tambah hidrogen yang berasal dari hasil reaksi antara serbuk seng dan asam sulfat encer, terbentuk gas stibin. Pada cawan porselen dingin yang diletakkan terbalik di atasnya, terjadi pemisahan logam warna gelap, tidak larut dalam larutan natrium hipoklorit encer. Larut dalam larutan asam tartrat.

Asetat

Jika dihangatkan dengan asam oksalat, terbentuk asam asetat dan bau khas.

Jika dihangatkan dengan asam sulfat dan sedikit etanol (95%), terbentuk etil asetat dan bau khas.

Jika dipanaskan dengan kalsium oksida, terbentuk aseton, jika uapnya mengenai kertas saring yang dibasahi dengan 2 nitrobenzaldehyd 2% b/v dalam etanol (95%) (yang dikeringkan dan dibasahi dengan natrium hidroksida 1 M). Terbentuk warna biru indigo.

Barium

Larutan garam barium dengan asam sulfat encer, terbentuk endapan putih yang praktis tidak larut dalam asam hidroklorida atau asam nitrat.

Garam barium dalam nyala api, terbentuk warna hijau kekuningan dalam nyala api dan jika dilihat dengan kaca hijau, nyala berwarna biru.

Benzoat

Jika dihangatkan dengan asam sulfat, tidak terbentuk arang, tetapi menyublim putih pada dinding tabung.

Pada larutan asam benzoat, tambah asam hidroklorida encer; terbentuk endapan putih. Bilas endapan dengan air sampai bebas klorida, suhu lebur 122°C. Endapan mudah larut dalam kloroform dan eter.

Pada larutan benzoat netral, tambah larutan besi (III) klorida, terbentuk endapan merah, tambah asam hidroklorida, terbentuk endapan asam benzoat.

Besi

Larutan senyawa besi (II) dan besi (III) dengan larutan amonium sulfida, terbentuk endapan hitam. Endapan larut dalam asam hidroklorida encer dan bebas gas hidrogen sulfida.

Besi (II)

Larutkan garam besi (II) dalam asam sulfat encer, tambah 1,1-o-fenantrolin 0,1% b/v, terbentuk warna merah kuat, tambah serum (IV) amonium sulfat 0,1 M sedikit berlebih, larutan tidak berwarna.

Pada larutan garam besi (II), tambah larutan kalium heksasioanoferrat (III), terbentuk endapan biru tua. Praktis tidak larut dalam asam hidroklorida encer dan terurai oleh larutan natrium hidroksida.

Pada larutan garam besi (II), tambah larutan kalium heksasianoferrat (II), terbentuk endapan putih yang cepat berubah menjadi biru. Praktis tidak larut dalam asam hidroklorida encer

Besi (III)

Asamkan larutan besi (III) dengan asam hidroklorida encer, tambah larutan amonium tiosianat, terbentuk warna merah yang terekstrak dalam eter atau amilalkohol. Tambah larutan raksa (II) klorida atau asam fosfat, terbentuk warna merah.

Pada larutan garam besi (III), tambah larutan kalium heksasianoferrat (II), terbentuk endapan biru kuat. Praktis tidak larut dalam asam hidroklorida encer.

Asamkan larutan garam besi (III) dengan asam asetat, tambah asam 8 hidrokso 7 iodokinolina 5 sulfonat 0,2% b/v, terbentuk warna hijau kuat.

Bikarbonat

Pada larutan garam bikarbonat, tambah asam encer, terbentuk karbondioksida yang jika dialirkan ke dalam larutan kalsium hidroksida, terbentuk endapan putih.

Jika dididihkan larutan garam bikarbonat bebas karbondioksida. Pada larutan garam bikarbonat, tambah larutan magnesium sulfat, dididihkan, terbentuk endapan putih.

Bismut

Larutan garam bismut dalam asam hidroklorida atau asam nitrat, tambah air berlebih, terbentuk endapan putih. Tambah larutan natrium sulfida, terbentuk endapan coklat.

Pada larutan garam bismut dalam sedikit campuran 1 volume asam nitrat dan 2 volume air, tambah larutan

kalium iodida, terbentuk endapan hitam. Tambah larutan kalium iodida berlebih, endapan larut dan terbentuk warna coklat kekuningan, encerkan dengan air, panaskan, terbentuk endapan orange seperti warna tembaga.

Bisulfit

Memenuhi syarat seperti yang tertera pada reaksi identifikasi sulfit.

Borat

Asamkan larutan borat dengan asam hidroklorida, terbentuk warna merah kecoklatan pada kertas kurkuma. Jika dikeringkan warna menjadi lebih kuat, jika dibasahi dengan amonia encer, terbentuk warna hitam kehijauan.

Asamkan 1 ml larutan borat dengan asam hidroklorida, tambah 3—4 tetes iodium (0,1% b/v) dan 3—4 tetes polivinil etanol (2% b/v), terbentuk warna biru kuat.

Campur borat dengan asam sulfat dan metanol, pijarkan, terbentuk warna hijau pada nyala api.

Bromida

Larutan bromida jika dipanaskan dengan asam sulfit dan mangan (IV) oksida atau kalium bikromat, terbentuk brom yang memberikan warna merah muda pada kertas saring [yang dibasahi dengan natrium fluoresein 0,2% b/v dalam etanol (95%)].

Pada larutan bromida tambahkan larutan perak nitrat, terbentuk endapan kekuningan yang larut dalam amonia, sukar larut dalam amonia encer, praktis tidak larut dalam asam nitrat encer.

Pada larutan bromida, tambah larutan klor, terbentuk brom yang larut dalam 2—3 tetes karbondisulfida atau kloroform, dengan warna kemerahan. Tambah larutan fenol pada lapisan air yang mengandung brom, terbentuk endapan putih. Pada pengujian bromida yang mengandung iodida, semua iodium harus dihilangkan lebih dahulu dengan mendidihkan lapisan air dengan timbal (II) oksida berlebih.

Fosfat

Netralkan larutan fosfat sampai pH 7, tambah larutan perak nitrat, terbentuk endapan kekuningan yang mudah larut dalam amonia encer dan asam nitrat encer.

Pada larutan fosfat, tambah larutan magnesium sulfit amonia, terbentuk endapan putih.

Pada larutan fosfat dalam asam nitrat encer, tambah larutan amonium molibdat dengan volume yang sama, hangatkan, terbentuk endapan warna kekuningan.

Iodida

Pada larutan iodida, tambah larutan perak nitrat, terbentuk endapan kuning yang praktis tidak larut dalam amonia encer dan asam nitrat.

Pada larutan iodida, tambah larutan kalium iodat dan asam asetat encer, terbentuk iodium yang memberikan warna violet kemerahan dengan kloroform, dan warna biru dengan larutan kanji.

Pada larutan iodida, tambah larutan raksa (II) klorida,

terbentuk endapan merah yang agak sukar larut dalam pereaksi di atas dan mudah larut dalam larutan kalium iodida.

Kalium

Asamkan senyawa kalium dengan asam hidroklorida, pijarkan pada sebatang kawat platina dalam nyala api tidak berwarna, terbentuk warna violet. Jika diamati dengan kaca biru yang sesuai, warna nyala api ungu kemerahan.

Pada larutan garam kalium pekat yang telah bebas garam amonium dengan pemijaran, tambah larutan platina (IV) klorida dan asam hidroklorida, terbentuk endapan kuning, pijarkan, residu pemijaran adalah kalium klorida dan platina.

Kocok 2 ml larutan garam kalium jenuh yang mengandung tidak kurang dari 5% b/v dengan 10 tetes larutan asam tartrat jenuh, terbentuk endapan putih.

Kalsium

Pada larutan garam kalsium, tambah larutan amonium karbonat, terbentuk endapan putih. Didihkan, dinginkan, endapan sukar larut dalam larutan amonium klorida.

Pada larutan garam kalsium, tambah larutan amonium oksalat, terbentuk endapan putih yang larut dalam asam hidroklorida, tetapi agak sukar larut dalam asam asetat.

Pada 1 tetes larutan garam kalsium, tambah 4 tetes glioksal bis-(2 hidroksianil) (1% b/v) dalam etanol (95%) dan 1 tetes natrium hidroksida 10% b/v, terbentuk endapan coklat kemerahan yang larut dalam kloroform, larutan berwarna merah.

Karbonat

Pada karbonat, tambah asam encer, terbentuk busa bebas karbondioksida yang jika dialirkan ke dalam larutan kalsium hidroksida, terbentuk endapan putih.

Pada larutan karbonat, tambah larutan magnesium sulfat, terbentuk endapan putih.

Klorida

Panaskan larutan klorida dengan asam sulfat dan mangan (IV) oksida, terbentuk klor yang memutihkan kertas lakmus basa dan terbentuk warna biru pada kertas kanji iodida.

Pada larutan klorida, tambah larutan perak nitrat, terbentuk endapan putih yang tidak larut dalam asam nitrat. Endapan larut dalam amonia encer setelah dibilas dengan air, tambah asam nitrat, terbentuk endapan baru.

Kobalt

Pada larutan senyawa kobalt, tambah natrium hidroksida 1 M, terbentuk endapan biru yang segera berubah menjadi hijau lumut. Jika dididihkan segera setelah terjadi endapan, warna endapan berubah menjadi merah muda.

Pada larutan garam kobalt, jenuhkan dengan kalium klorida, tambah kalium nitrit dan asam asetat, terbentuk endapan kuning.

Magnesium

Pada larutan garam magnesium, tambah larutan amonium karbonat, dididihkan, terbentuk endapan putih, jika terdapat larutan amonium klorida, tidak terbentuk endapan.

Pada larutan garam magnesium, tambah larutan dinatrium hidrogen fosfat yang mengandung garam amonium dan amonia encer, terbentuk kristal putih.

Pada larutan garam magnesium, tambah kuning titan 0,1% dan natrium hidroksida (10% b/v), terbentuk kekeruhan warna merah terang yang lama kelamaan menjadi endapan merah coklat.

Natrium

Asamkan senyawa natrium dengan asam hidroklorida, pijarkan pada sebatang kawat platina dalam nyala api, terbentuk nyala api berwarna kuning.

Asamkan larutan garam natrium dengan asam asetat, saring, tambah larutan magnesium uranil asetat berlebih, terbentuk kristal kuning.

Pada larutan garam natrium, tambah larutan kalium antimonat, perlahan lahan terbentuk kristal putih.

Nitrat

Pada senyawa nitrat, tambah asam sulfat dan tembaga, terbentuk gas merah.

Pada larutan nitrat, tambah larutan besi (II) sulfat, tidak terbentuk warna coklat, jika ditambahkan dengan hati hati asam sulfat sampai terbentuk 2 lapisan, batas berwarna coklat.

Larutan nitrat, jika dicampur perlahan lahan dengan asam sulfat, pada penambahan kristal brusin terbentuk warna merah.

Penisilin

Campur 2 ml senyawa penisilin dengan 2 mg natrium kromotropat dan 2 ml asam sulfat, panaskan pada suhu 150°C, kocok, amati tiap 30 detik, larutan berwarna seperti tertera pada tabel dibawah. Jika pengujian dilakukan pada benzatin penisilin, benzil penisilin atau prokain penisilin, terbentuk warna kekuningan sebelum larutan mengarang.

Waktu (menit)	Ampisilin	Benzil-penisilin	Kloksasilin
0	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Tidak berwarna
¼	–	–	–
½	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Kekuningan
¾	–	–	–
1	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Kuning kehijauan
2	Keunguan	Kuning	Hijau
2 ½	Ungu tua kehijauan	Kuning	Ungu lumut
3	Violet kecoklatan	Kuning lumut	Ungu kekuningan

Waktu (menit)	Ampisilin	Benzil-penisilin	Kloksasilin
3 ¼	Violet	Hitam kecoklatan	Ungu kekuningan
4	Kehitaman	–	Ungu
4 ¼	–	–	Ungu
5	–	–	Ungu

Perak

Pada larutan garam perak, tambah larutan klorida atau asam hidroklorida, terbentuk endapan warna putih yang larut dalam amonia encer, praktis tidak larut dalam asam nitrat.

Pada larutan garam perak, tambah larutan kalium kromat, terbentuk endapan warna merah yang larut dalam asam nitrat.

Pada larutan garam perak, tambah dengan amonia encer kemudian asamkan dengan asam asetat, kocok dengan 4 dimetilamino- benzilidenrodamin 0,25% b/v dalam amil-alkohol, terbentuk endapan merah.

Permanganat

Asamkan larutan permanganat dengan asam sulfat, tambah hidrogen peroksida encer atau larutan natrium bisulfit, warna hilang dalam keadaan dingin dan tambah asam oksalat, warna hilang dalam keadaan panas.

Peroksida

Asamkan larutan peroksida dengan asam sulfat, tambah larutan kalium dikromat, terbentuk warna larutan biru tua, kocok dengan eter volume yang sama, biarkan terpisah, lapisan eter berwarna biru.

Raksa

Teteskan larutan raksa garam bebas asam nitrat berlebih pada lempeng tembaga mengkilat, jika digosok menjadi mengkilat seperti perak, terbentuk bercak. Pada larutan garam perak, tambah hidrogen sulfida, terbentuk endapan hitam yang tidak larut dalam larutan amonium sulfida dan asam nitrat encer mendidih.

Raksa (I)

Pada larutan senyawa raksa (I), tambah larutan natrium hidroksida encer terurai menjadi hitam dengan penambahan amonia encer.

Pada larutan senyawa raksa (I), tambah larutan kalium iodida, terbentuk endapan kuning, jika dibiarkan, terbentuk endapan hijau.

Raksa (II)

Pada larutan garam raksa (II), tambah larutan natrium hidroksida encer; terbentuk endapan kuning.

Netralkan larutan garam raksa (II) dengan larutan kalium iodida, terbentuk endapan merah tua yang sangat mudah larut dalam pereaksi berlebih.

Seng

Pada larutan garam seng, jika perlu dibuat dengan

penambahan asam hidroklorida, tambah larutan alkali hidroksida, terbentuk endapan putih yang larut dalam larutan alkali hidroksida berlebih. Tambah larutan amonium klorida, larutan tetap jernih, tambah larutan natrium sulfida, terbentuk endapan putih.

Pada larutan garam seng, tambah larutan kalium heksasianoferat (II), terbentuk endapan putih yang praktis tidak larut dalam asam hidroklorida encer.

Asamkan larutan garam seng dengan asam sulfat encer, tambah 1 tetes tembaga (II) sulfat (0,1% b/v) dan 2 ml larutan amonium raksa (II) tiosianat, terbentuk endapan violet.

Sitrat

Didihkan larutan sitrat netral dengan larutan kalsium klorida berlebih, dalam keadaan dingin tidak terbentuk endapan, didihkan, terbentuk endapan putih yang larut dalam asam asetat.

Didihkan larutan sitrat dengan larutan raksa (II) sulfat berlebih, jika perlu saring, didihkan, tambah beberapa tetes larutan kalium permanganat, larutan tidak berwarna, terbentuk endapan putih.

Sulfat

Pada larutan sulfat, tambah larutan barium klorida, terbentuk endapan putih yang praktis tidak larut dalam asam hidroklorida.

Pada larutan sulfat, tambah larutan timbal (II) asetat, terbentuk endapan putih yang larut dalam larutan amonium asetat dan dalam larutan natrium hidroksida.

Sulfit

Pada senyawa sulfit, tambah asam hidroklorida encer, terbentuk belerang dioksida yang dapat diketahui dari baunya, dapat menghitamkan kertas saring yang dibasahi dengan larutan raksa (I) nitrat.

Tartrat

Pada larutan netral tartrat, tambah larutan perak nitrat berlebih, terbentuk endapan putih yang larut dalam asam nitrat dan amonia encer, jika dipanaskan, terbentuk perak yang menempel pada dinding tabung.

Asamkan larutan tartrat dengan asam asetat, tambah 1 tetes larutan besi (II) sulfat, beberapa tetes hidrogen peroksida encer dan larutan natrium hidroksida berlebih, terbentuk warna ungu atau violet.

Tambah beberapa tetes larutan tartrat ke dalam asam sulfat yang telah dicampur dengan beberapa tetes resersinol (2% b/v) dan kalium bromida (10% b/v), hangatkan di atas penangas air selama 5—10 menit, terbentuk warna biru kuat, jika didinginkan dan tambah air, terbentuk warna merah.

Timbal

Pada larutan garam timbal, tambah asam sulfat encer, terbentuk endapan putih yang tidak larut dalam asam hidroklorida, tetapi larut dalam natrium hidroksida I M hangat dan amonium asetat (10% b/v).

Pada larutan garam timbal bebas asam mineral, tambah kalium kromat (10% b/v), terbentuk endapan kuning

yang praktis tidak larut dalam asam asetat, tetapi larut dalam natrium hidroklorida 1 M.

Tiosulfat

Pada larutan tiosulfat, tambah asam hidroklorida, terbentuk endapan putih yang segera berubah menjadi kuning dengan membebaskan belerang dioksida yang dapat diketahui dari baunya.

Pada larutan tiosulfat, tambah larutan besi (II) hidroklorida, terbentuk warna ungu tua yang segera hilang.

Spektrofotometri

Spektrofotometri meliputi spektrofotometri ultraviolet, cahaya tampak dan spektrum serapan inframerah.

Spektrofotometri Ultraviolet dan Cahaya Tampak

Spektrofotometri adalah pengukuran serapan radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang tertentu yang sempit, serapan zat mendekati monokromatik. Pengukuran serapan dapat dilakukan pada daerah ultraviolet (panjang gelombang 190 nm—380 nm) atau pada daerah cahaya tampak (panjang gelombang 380 nm—1100 nm). Meskipun spektrum pada daerah ultraviolet dan cahaya tampak dari suatu zat tidak khas, tetapi sangat sesuai untuk penetapan kuantitatif, dan untuk beberapa zat berguna untuk membantu identifikasi.

Istilah dan definisi

Serapan (A) adalah nilai logaritma kebalikan transmitan (T). Serapan (A) adalah logaritma dengan bilangan pokok 10 dan harga perbandingan terbalik T.

Transmitan (T) adalah perbandingan intensitas radiasi yang diteruskan terhadap intensitas radiasi yang datang

Daya serap (a) adalah serapan (A) dibagi dengan hasil perkalian kadar (c), dinyatakan (g/l) dan tebal lapisan zat yang menyerap sinar (b) dinyatakan (cm).

$$a = \frac{A}{b \cdot c}$$

Serapan jenis (A 1%, 1 cm) adalah serapan (A) dibagi dengan hasil perkalian kadar (c), dinyatakan dalam g/100 ml dan tebal lapisan zat yang menyerap sinar (b) dinyatakan (cm).

$$A(1\%, 1\text{ cm}) = 10 \times a.$$

Spektrum serapan adalah hubungan antara serapan atau fungsi serapan dengan panjang gelombang atau fungsi panjang gelombang, yang biasanya digambarkan dalam bentuk grafik.

Daya serap atau serapan jenis zat pada batas kadar tertentu adalah tetap, tidak tergantung dari intensitas radiasi, panjang jalan sinar dan kadar larutan, sampai serapan spektrofotometri dapat digunakan untuk penetapan kadar. Penyimpangan dari ketentuan

tersebut dapat disebabkan oleh adanya variasi alat atau akibat adanya perubahan fisiko kimia. Penyimpangan oleh alat dapat disebabkan oleh lebar celah, sinar hambur atau sinar polikromatik. Perubahan fisiko kimia dapat berupa terjadinya perubahan kadar yang disebabkan oleh terjadinya asosiasi antara molekul zat yang terlarut atau antara molekul zat dan molekul pelarut, atau terjadinya disosiasi atau ionisasi.

Peralatan

Spektrofotometer pada dasarnya terdiri atas sumber sinar monokromator, tempat kuvet untuk zat yang diperiksa, detektor, penguat arus dan alat ukur atau pencatat. Spektrofotometer dapat bekerja secara otomatis ataupun tidak, dapat mempunyai sistem sinar tunggal atau ganda. Kuvet yang digunakan untuk pengukuran pada daerah ultraviolet dibuat dari silika, sedang untuk pengukuran pada daerah sinar tampak dibuat dari kaca, yang banyak digunakan adalah kuvet dengan tebal 1 cm. Kuvet yang akan digunakan untuk larutan uji dan larutan blanko harus mempunyai transmittan yang sama jika masing-masing mengandung pelarut. Jika nilai transmittan tidak sama, harus dilakukan koreksi. Kebersihan kuvet harus mendapat perhatian secara khusus. Setelah kuvet dibilas dengan cairan pembersih, harus dibilas dengan air kemudian dengan pelarut organik yang mudah menguap agar cepat kering. Larutan uji tidak boleh dibiarkan di dalam kuvet lebih lama dari pada yang diperlukan untuk pengukuran. Kuvet tidak boleh dipegang pada permukaan yang dilewati sinar. Spektrofotometer secara teratur harus dikalibrasi baik terhadap skala panjang gelombang, maupun terhadap skala fotometer. Untuk kalibrasi skala panjang gelombang dapat digunakan penyaring kaca didinium atau penyaring kaca holmium. Kalibrasi skala fotometri biasanya dilakukan dengan larutan kalium dikromat.

Pelarut

Sebagai pelarut untuk penetapan spektrofotometri pada daerah cahaya ultraviolet dapat digunakan pelarut dengan spesifikasi untuk spektrofotometer atau yang sesuai. Pelarut yang digunakan sebagai blanko harus berasal dari lot yang sama dengan pelarut yang digunakan untuk membuat larutan yang diukur, serta tidak boleh berfluoresensi pada panjang gelombang pengukuran.

Identifikasi

Identifikasi zat secara spektrofotometri pada daerah ultraviolet pada umumnya dilakukan dengan menggambarkan spektrum serapan larutan zat dalam pelarut, dan kadar seperti yang tertera pada monografi, untuk menetapkan letak serapan maksimum atau minimum. Spektrum serapan dari zat yang diperiksa perlu dibandingkan dengan standar yang sesuai. Dalam hal ini standar tersebut dikerjakan dengan cara yang sama dan diukur dengan kondisi yang sama dengan zat yang diperiksa. Kecuali dinyatakan lain dalam monografi, larutan standar sampai kadarnya sama atau dalam batas $\pm 10\%$ dari kadar zat uji. Dalam daerah ultraviolet identifikasi dapat pula dilakukan

dengan menghitung nilai perbandingan serapan pada 2 maksimum. Dengan cara ini dapat dihindari kesalahan yang disebabkan oleh pengaruh alat dan tidak diperlukan larutan standar.

Penetapan kuantitatif

Penetapan secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur serapan larutan zat dalam pelarut serta pada panjang gelombang tertentu. Pengukuran serapan biasanya dilakukan pada panjang gelombang serapan maksimum seperti yang tertera pada monografi. Oleh karena letak serapan maksimum dapat berbeda jika digunakan alat yang berbeda, maka sebaliknya pengukuran dilakukan pada panjang gelombang serapan maksimum yang diperoleh dengan alat yang digunakan harus pada panjang gelombang yang diperoleh tidak berbeda lebih dari $\pm 0,5$ nm pada panjang gelombang 240—280 nm, tidak lebih dari ± 1 nm pada panjang gelombang 280—320 nm, serta dan lebih dari ± 2 nm di atas panjang gelombang 320 nm, dari panjang gelombang yang ditentukan. Jika perbedaannya melebihi batas tersebut alat harus dikalibrasi. Pada pengukuran serapan suatu larutan hampir selalu digunakan blanko, berfungsi untuk mengatur spektrofotometer sampai pada panjang gelombang pengukuran mempunyai serapan nol.

Blanko adalah untuk koreksi serapan yang disebabkan oleh pelarut, pereaksi, kuvet atau pengaturan alat. Blanko dapat berupa blanko pelarut yang merupakan pelarut yang sama seperti yang digunakan untuk melarutkan zat atau blanko. Pereaksi yaitu pereaksi yang sama seperti yang digunakan untuk larutan zat. Jika dengan cara seperti tersebut di atas nilai serapan larutan zat telah diukur, kadar larutan dapat ditetapkan berdasarkan nilai serapan atau serapan jenis seperti yang tertera pada monografi, menggunakan persamaan seperti yang tertera pada istilah dan definisi di atas. Penetapan kadar dapat juga dilakukan dengan cara membandingkan serapan larutan zat uji terhadap larutan standar yang disiapkan dengan cara yang sama. Dalam hal ini pengukuran serapan mula mula dilakukan terhadap larutan standar kemudian terhadap larutan zat uji. Pengukuran kedua dilakukan secepat mungkin setelah pengukuran pertama. Sebagai pengganti zat standar dapat digunakan kurva standar yang dibuat menggunakan standar. Hal ini dapat dilakukan, jika zat yang diperiksa dalam batas kadar 75%—125% terhadap kadar larutan akhir memenuhi hukum Lambert Beer. Kurva standar harus diperiksa lagi secara berkala.

Spektrum Serapan Inframerah

Daerah spektrum elektromagnet inframerah yang digunakan untuk analisis obat meliputi 4000—250 cm^{-1} (2,5—40 μm). Spektrum serapan inframerah suatu zat mempunyai gambaran yang khas untuk zat yang bersangkutan, sampai dapat digunakan sebagai identifikasi. Untuk keperluan identifikasi spektrum serapan zat uji dapat dibandingkan dengan spektrum

serapan standar yang ditetapkan dengan cara yang sama.

Istilah dan definisi

Sesuai dengan yang tertera pada spektrofotometri ultraviolet dan cahaya tampak.

Peralatan

Spektrofotometer inframerah pada dasarnya sama dengan spektrofotometer ultraviolet dan cahaya tampak, hanya berbeda pada sumber energi, bahan optik dan detektor. Spektrofotometer yang digunakan untuk identifikasi meliputi panjang gelombang 4000—670 cm^{-1} (2,5—15 μm). Spektrofotometer inframerah harus dikalibrasi terhadap skala panjang gelombang, misalnya menggunakan selaput polistiren.

Pelarut

Pelarut yang digunakan harus tidak merusak bahan yang digunakan untuk membuat kuvet, biasanya natrium klorida atau yang sesuai. Tidak ada pelarut pada daerah inframerah yang transparan. Karbon tetraklorida praktis transparan pada panjang gelombang 4000—1700 cm^{-1} . Dapat juga digunakan pelarut kloroform, klorometan dan dibrommetan. Karbon disulfida dapat digunakan sebagai pelarut sampai panjang gelombang 250 cm^{-1} , kecuali untuk panjang gelombang 2400 cm^{-1} , 2000 cm^{-1} dan 1800—1300 cm^{-1} .

Persiapan zat uji

Zat cair dapat diuji langsung atau dilarutkan dalam pelarut yang sesuai. Zat padat biasanya disiapkan dengan cara dispersi dalam parafin cair atau cakram kalium bromida. Cara menyiapkan zat uji dilakukan sebagai berikut :

Prosedur-1

Teteskan sedikit zat cair di antara 2 lempeng natrium klorida sampai terbentuk lapisan tipis, atau masukkan zat cair ke dalam kuvet dengan tebal yang sesuai.

Prosedur-2

Gerus 20 mg zat dengan 2 tetes parafin cair atau cairan yang sesuai sampai homogen. Letakkan sebagai pasta di antara 2 lempeng natrium klorida atau lempeng lain.

Prosedur-3

Gerus zat dengan serbuk halus kalium bromida yang kering, jika alat menggunakan prisma sebagai monokromator dengan perbandingan 1:200 atau jika alat menggunakan kisi sebagai monokromator dengan perbandingan 1:300. Masukkan sebagai campuran dalam cetakan, cetak dengan tekanan tinggi dalam hampa udara.

Prosedur-4

Larutkan zat dengan kadar yang sesuai dalam pelarut yang sesuai. Masukkan ke dalam kuvet yang tebalnya sesuai sampai menghasilkan spektrum yang baik.

Identifikasi menggunakan zat standar

Siapkan zat uji dan zat standar dengan cara yang sama. Spektrum serapan pada panjang gelombang

4000 cm^{-1} dan 670 cm^{-1} (2,5 μm dan 15 μm). Kadar zat harus sedemikian rupa sampai puncak spektrum yang terkuat terletak antara 5%—25% transmittansi. Jika disiapkan dengan prosedur 2 dan 3, letak serapan maksimum zat tidak sesuai dengan zat standar yang disebabkan oleh perbedaan bentuk kristalnya. Dalam hal ini pemeriksaan dapat dilakukan dalam bentuk larutan. Apabila hal ini tidak dapat dilakukan, zat uji dan standar, masing-masing diuapkan sampai kering. Pengujian diulangi menggunakan residu pengeringan. Jika spektrum parafin cair yang digunakan untuk prosedur 2, mengganggu spektrum zat pada daerah tertentu, dibuat dispersi zat dalam pelarut yang lain misalnya senyawa fluorohidrokarbon atau heksaklorobutadiena, untuk spektrum pada daerah di mana terjadi gangguan parafin cair.

Identifikasi menggunakan spektrum standar

Siapkan zat uji seperti cara yang tertera pada spektrum standar yang bersangkutan, dan spektrum dari 400 cm^{-1} —670 cm^{-1} . Dalam hal ini skala panjang gelombang dari alat harus dikalibrasi menggunakan selaput polistiren.

Standar

Zat standar yang digunakan sebagai standar dalam penetapan menggunakan prosedur yang sesuai, misalnya spektrofotometri dan kromatografi.

Zat standar tidak boleh digunakan sebagai obat. Kecuali dinyatakan lain, standar harus dikeringkan sebelum digunakan seperti cara yang tertera pada etiket untuk masing-masing zat.

Standar yang digunakan mampu telusur ke International Unit (IU).

Zat standar dalam rentang waktu tertentu harus dikalibrasi ulang.

Zat standar harus disimpan sesuai dengan spesifikasinya.

Zat standar yang sudah diencerkan disimpan pada suhu tertentu dan rentang waktu tertentu, sesuai dengan spesifikasinya.

Zat standar tidak boleh digunakan untuk pengujian rutin.

Zat standar yang dipergunakan untuk pengujian rutin adalah turunan atau bahan murni yang telah dikalibrasi terhadap standar.

Titration

Titration Bebas Air

Prosedur I untuk basa dan garamnya.

Kecuali dinyatakan lain, larutkan zat seperti yang tertera pada masing-masing monografi dalam volume

asam asetat glasial yang sebelumnya telah dinetralkan dengan asam perklorat 0,1 M menggunakan indikator kristal violet. Jika perlu, hangatkan dan dinginkan. Jika zat uji berupa garam halogenida, tambah 10 ml larutan raksa (II) asetat. Titrasi dengan asam perklorat 0,1 M sampai perubahan warna indikator sesuai dengan nilai maksimum dE/dV jika titrasi dilakukan secara potensiometrik, E adalah daya elektromotif dalam mV dan V adalah volume dalam ml. Jika digunakan indikator lain, indikator tersebut harus pula digunakan untuk menetralkan asam asetat glasial, larutan raksa (II) asetat dan untuk pembakuan asam perklorat. Jika titik akhir titrasi ditetapkan secara potensiometrik, dapat digunakan elektroda kaca sebagai elektroda indikator dan elektroda kalomel sebagai elektroda standar. Hasil akan lebih baik jika larutan kalium klorida jenuh pada elektroda kalomel diganti dengan litium perklorat (1% b/v) dalam asam asetat glasial.

Prosedur II untuk asam

Lakukan titrasi menggunakan zat uji, pelarut, titran dan indikator seperti yang tertera pada masing-masing monografi. Netralkan pelarut terhadap indikator menggunakan penitar yang akan digunakan untuk titrasi. Selama penetapan larutan harus terlindung dari karbondioksida dengan mengalirkan nitrogen di atas larutan. Jika perlu hangatkan larutan zat. Titrasi sampai perubahan warna indikator sesuai dengan nilai maksimum dE/dV jika titrasi dilakukan secara potensiometrik, E adalah daya elektromotif dalam mV dan V adalah volume titran dalam ml. Jika titik akhir titrasi ditetapkan secara potensiometrik, dapat digunakan elektroda kaca sebagai elektroda indikator dan elektroda kalomel sebagai elektroda standar. Hasil akan lebih baik jika larutan kalium klorida jenuh pada elektroda kalomel diganti dengan larutan kalium klorida jenuh dalam metanol.

Titration Kompleksometri

Titration kompleksometri adalah titration berdasarkan pembentukan senyawa kompleks antara kation dengan zat pembentuk kompleks. Sebagai zat pembentuk kompleks yang banyak digunakan dalam titration kompleksometri adalah garam dinatrium etilendiamina tetraasetat (dinatrium EDTA). Kestabilan dari senyawa kompleks yang terbentuk tergantung dari sifat kation dan pH dari larutan, oleh karena titration harus dilakukan pada pH tertentu. Untuk memantapkan titik akhir titration digunakan indikator logam, yaitu indikator yang dapat membentuk senyawa kompleks dengan ion logam. Ikatan kompleks antara indikator dan ion logam harus lebih lemah dari pada ikatan kompleks larutan penitar dan ion logam. Larutan indikator bebas mempunyai warna yang berbeda dengan larutan indikator kompleks. Indikator yang banyak digunakan dalam titration kompleksometri adalah kalkon, asam kalkon karboksilat, hitam eriokrom T dan silenol orange. Titrasi langsung, untuk logam yang cepat dapat membentuk senyawa kompleks, sedangkan titration kembali untuk yang lambat membentuk senyawa kompleks. Prosedur titration untuk beberapa logam

sebagai berikut :

Aluminium

Larutkan zat uji yang ditimbang seperti yang tertera pada monografi dalam 2 ml asam hidroklorida 1 M dan 50 ml air, tambah 50,0 ml dinatrium edetat 0,05 M, netralkan dengan natrium hidroksida 1 M menggunakan indikator larutan merah metil. Didihkan larutan, biarkan di atas penangas air selama 10 menit, dinginkan dan tambah 5 g heksamida. Titrasi dengan timbal nitrat 0,05 M menggunakan indikator sekitar 50 mg silenol orange, sampai terbentuk warna merah muda. Setiap ml dinatrium edetat 0,05 M setara dengan 1,349 mg Al.

Bismut

Larutkan zat uji yang ditimbang seperti yang tertera pada monografi dalam sedikit asam nitrat encer, tambah 50 ml air dan atur pH 1—2 dengan asam nitrat encer atau amonia encer. Titrasi dengan dinatrium edetat 0,05 M menggunakan indikator 50 mg silenol orange, sampai terbentuk warna kuning. Setiap ml dinatrium edetat 0,05 M setara dengan 10,45 mg Bi.

Kalsium

Larutkan zat uji yang ditimbang seperti yang tertera pada monografi dalam air, jika perlu asamkan dengan sedikit asam hidroklorida encer, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml. Titrasi dengan dinatrium edetat 0,05 M. Pada 2 ml sebelum titik akhir titration, tambah 4 ml natrium hidroksida (30% b/v), 100 mg kalkon atau asam kalkon karboksilat dan kocok. Lanjutkan titration sampai terbentuk warna biru. Setiap ml dinatrium edetat 0,05 M setara dengan 2,004 mg Ca.

Magnesium

Larutkan zat uji yang ditimbang seperti yang tertera pada monografi dalam 5—10 ml air, jika perlu asamkan dengan sedikit asam hidroklorida encer, encerkan dengan air sampai batas volume 50 ml, dan tambah 10 ml dapar amonium klorida pH 10. Titrasi dengan dinatrium edetat 0,05 M menggunakan 100 mg hitam mordan sebagai indikator, sampai terbentuk warna hijau. Setiap ml dinatrium edetat setara dengan 1,215 mg Mg.

Seng

Larutkan zat uji yang ditimbang seperti yang tertera pada monografi dalam 5—10 ml air. Jika perlu, asamkan dengan asam asetat, encerkan dengan air sampai batas volume 50 ml, dan tambah 50 mg silenol orange dan 5 g heksamida, sampai terbentuk warna merah. Titrasi dengan dinatrium edetat 0,05 M sampai terbentuk warna kuning. Setiap ml dinatrium edetat 0,05 M setara dengan 3,268 mg Zn.

Timbal

Larutkan zat uji yang ditimbang seperti yang tertera pada monografi dalam 5—10 ml air. Jika perlu, asamkan dengan sedikit asam asetat, encerkan dengan air sampai batas volume 50 ml. Tambah 50 mg silenol orange dan 5 g heksamida, sampai terbentuk warna merah. Titrasi dengan dinatrium asetat 0,05 M sampai

terbentuk warna kuning. Setiap ml dinatrium asetat 0,05 M setara dengan 70,35 mg Pb.

Nitrimetri

Timbang 500 mg atau seperti yang tertera pada monografi, tambah 20 ml asam hidroklorida dan 50 ml air, aduk sampai larut, dinginkan sampai suhu 15°C. Titrasi dengan natrium nitrit 0,1 M, tentukan titik akhir secara potensiometri menggunakan elektroda natrium atau elektroda yang sesuai. Letakkan ujung buret di bawah permukaan larutan untuk menghindari oksidasi udara terhadap natrium nitrit. Aduk perlahan-lahan menggunakan pengaduk magnetik, tanpa menimbulkan putaran gelembung udara di bawah permukaan larutan. Selama titrasi, pertahankan pada suhu 15°C. Jika mendekati titik akhir, tiap selang waktu sekitar 1 menit, tambah 0,1 ml natrium nitrit 0,1 M sampai jarum kembali pada tempat semula.

Uji Batas

Arsen

Pengujian ini dimaksudkan untuk menunjukkan batas cemaran arsen yang masih diperbolehkan.

Peralatan

Botol 120 ml mulut lebar, sumbat dengan karet yang ditembus pipa kaca, panjang 200 mm, diameter dalam 6,5 mm, diameter luar ± 8 mm dan ujung bawah disempitkan sampai diameter dalam ± 1 mm. Pada dinding pipa dekat bagian yang disempitkan dibuat sebuah lubang diameter tidak kurang dari 2 mm. Ujung atas dipotong rata dan dihaluskan dengan pembakaran atau diasah. Jika botol diisi dengan 70 ml cairan, ujung yang disempitkan harus berada di atas permukaan cairan, sedangkan lubang samping berada di bawah sumbat. Dua buah sumbat karet ukuran sekitar 25 mm, masing-masing berlubang di bagian tengah dengan diameter 6,5 mm dihubungkan dengan penjepit pegas atau penjepit lainnya yang sesuai. Sumbat karet tersebut dapat diganti seperti yang tertera pada pengujian.

Pereaksi

- **Amonium oksalat.** Panaskan 5 g dengan 15 ml air, 5 ml asam nitrat dan 10 ml asam sulfat dalam labu dasar bulat leher pendek sampai mendidih, dinginkan dan lanjutkan pengujian seperti cara yang tertera pada pengujian, tidak terjadi bercak.
- **Larutan arsen pekat.** Larutkan 1,32 g arsen trioksida dalam 50 ml asam hidroklorida, tambah air sampai batas volume 100,0 ml.
- **Larutan arsen encer.** Encerkan 1,0 ml larutan dengan air sampai batas volume 100,0 ml. Setiap ml larutan arsen encer mengandung 100 μ g As. Larutan harus segar.
- **Asam hidroklorida (32%).** Memenuhi syarat berikut: (A). Encerkan 10,0 ml dengan air sampai

batas volume 50,0 ml, tambah 5,0 ml larutan amonium tiosianat, aduk, tidak terbentuk warna. (B). Pada 50,0 ml, tambah 0,2 ml air brom, uapkan di atas penangas air sampai residu 16 ml. Jika perlu, tambah air brom sampai selama penguapan tetap terdapat kelebihan brom yang dapat diketahui dari warnanya. Tambah 50 ml air dan 5 tetes larutan timah (II) klorida, lanjutkan seperti yang tertera pada pengujian; bercak yang terbentuk tidak lebih kuat dari bercak standar yang dibuat dengan 0,2 ml larutan arsen encer; menunjukkan As tidak lebih dari 0,05 ppm.

- **Asam hidroklorida brom.** Campur 1,0 ml air brom dan 100,0 ml asam hidroklorida.
- **Asam hidroklorida timah.** Campur dari 1,0 ml larutan timah (II) klorida dan 100,0 ml asam hidroklorida.
- **Asam nitrat.** Panaskan 20,0 ml dalam cawan porselen dengan 2,0 ml asam sulfat sampai asap putih hilang, dinginkan. Tambah 2,0 ml air, panaskan lagi sampai asap putih hilang, dinginkan. Tambah 50,0 ml air dan 10,0 ml asam hidroklorida timah, lanjutkan seperti yang tertera pada pengujian; tidak terjadi bercak.
- **Asam sulfat.** Encerkan 10,0 g dengan 50,0 ml air, tambah 0,2 ml larutan timah (II) klorida, lanjutkan seperti yang tertera pada pengujian; tidak terjadi bercak.
- **Air brom.** Larutkan 30,0 g brom dan 30,0 g kalium bromida dalam air sampai batas volume 100,0 ml. Air brom memenuhi syarat berikut: Uapkan 10,0 ml di atas penangas air sampai mendekati kering, tambah 50,0 ml air, 10,0 ml asam hidroklorida dan larutan timah (II) klorida, sampai residu brom hilang. Lanjutkan seperti yang tertera pada pengujian, bercak yang terbentuk tidak lebih kuat dari bercak standar yang dibuat dengan 1,0 ml larutan arsen encer, menunjukkan As tidak lebih dari 1 ppm.
- **Kalium iodida.** Larutkan 10,0 g dalam 25,0 ml asam hidroklorida dan 35,0 ml air, tambah 2 tetes larutan timah (II) klorida, lanjutkan seperti yang tertera pada pengujian, tidak terjadi bercak.
- **Kalium klorat.** Campur dalam suasana dingin 5,0 g dengan 20,0 ml air dan 22,0 ml asam hidroklorida, setelah reaksi selesai, hilangkan klor dengan pemanasan hati-hati, kemudian tambah beberapa tetes larutan timah (II) klorida, sampai residu klor hilang. Tambah 20,0 ml air, lanjutkan seperti yang tertera pada pengujian, tidak terjadi bercak.
- **Natrium karbon anhidrat.** Larutkan 5,0 g dalam 50,0 ml air, tambah 20,0 ml asam hidroklorida brom, tambah beberapa tetes larutan timah (II) klorida, sampai kelebihan brom hilang, lanjutkan seperti yang tertera pada pengujian, tidak terjadi bercak.
- **Seng.** Tambah 10,0 ml asam hidroklorida timah dalam 50,0 ml air, lanjutkan seperti yang tertera pada pengujian menggunakan 10,0 g seng butir

biarkan selama 1 jam, tidak terjadi bercak. Ulangi pengujian, tambah 0, 1 ml larutan arsen encer, terbentuk bercak kuning pucat.

- **Larutan timah (II) klorida.** Campur larutan timah (II) klorida dengan asam hidroklorida volume yang sama, dididihkan sampai volume sama, saring dengan kertas saring halus. Larutan timah (II) klorida memenuhi syarat berikut : Pada 10,0 ml, tambah 6,0 ml air dan 10,0 ml asam hidroklorida, sulingkan sampai volume 16,0 ml. Pada sulingan, tambah 50,0 ml air dan 2 tetes larutan timah (II) klorida, lanjutkan seperti yang tertera pada pengujian; bercak yang terbentuk tidak lebih kuat dari bercak standar yang dibuat dengan 1,0 ml larutan arsen encer, menunjukkan As tidak lebih dari 1 ppm.

Pengujian

Basahi kapas dengan larutan timbal (II) asetat dan keringkan, masukkan ke dalam pipa kaca sampai permukaan atas kapas tidak kurang dari 25 mm di bawah ujung pipa. Masukkan ujung atas pipa sepanjang 10 mm ke dalam salah satu sumbat karet. Letakkan selembar kertas raksa (II) klorida pada permukaan sumbat bagian atas. Letakkan sumbat lain di atasnya, rapatkan dengan penjepit pegas sampai lubang kedua sumbat membentuk sebuah saluran lurus disekat oleh kertas raksa (II) klorida. Penjepit dapat dilakukan dengan cara lain, (1) seluruh gas harus keluar melalui kertas, (2) bagian kertas yang kena gas berupa lingkaran diameter 6,5 mm, (3) kertas terlindung dari cahaya matahari selama pengujian. Masukkan larutan uji ke dalam botol, tambah 1,0 g kalium iodida dan 10,0 g seng, pasang segera pipa, biarkan selama 40 menit. Terbentuk bercak kuning pada kertas raksa (II) klorida jika terdapat arsen, dibandingkan pada cahaya matahari terhadap bercak standar yang dihasilkan dengan cara kerja dan waktu yang sama menggunakan larutan arsen encer dengan kadar yang telah diketahui. Perbandingan bercak dilakukan dengan segera. Bercak standar yang digunakan harus segar. Dengan membandingkan tingkat warna terhadap bercak standar, kadar arsen dapat ditetapkan. Jika digunakan 10,0 g zat uji dan dibandingkan dengan bercak standar menggunakan 1,0 ml larutan arsen encer, bercak yang terbentuk menunjukkan arsen 1 ppm.

Pengujian dapat dipercepat dengan meletakkan botol di atas permukaan yang hangat, umumnya bersuhu tidak lebih dari 40°C, sambil dijaga agar kertas raksa (II) klorida tetap kering selama pengujian. Tabung dibilas dengan asam hidroklorida, kemudian dengan air dan keringkan setiap kali akan digunakan.

Bercak standar adalah bercak pada kertas raksa (II) klorida yang terbentuk seperti yang tertera pada pengujian menggunakan larutan yang dibuat sebagai berikut: Kecuali dinyatakan lain. Pada 50,0 ml air, tambah 10,0 ml asam klorida timah dan 1,0 ml larutan arsen.

Larutan uji

- **Amonia.** Tidak lebih dari 0,4 ppm. Uapkan 25,0 ml di atas penangas air sampai volume 5 ml, tambah

40,0 ml air dan 15,0 ml asam hidroklorida brom, tambah beberapa tetes larutan timah (II) klorida sampai kelebihan brom hilang.

- **Asam asetat.** Tidak lebih dari 1 ppm. Campur 10,0 g dengan 50,0 ml air dan 10,0 ml asam hidroklorida timah.
- **Asam laktat.** Tidak lebih dari 1 ppm. Campur 10,0 g zat uji dengan 50,0 ml air, tambah 10,0 ml asam hidroklorida timah.
- **Asam sitrat.** Tidak lebih dari 1 ppm. Larutkan 10,0 g zat uji dalam 50,0 ml air, tambah asam hidroklorida timah.
- **Asam sitrat anhidrat.** Tidak lebih dari 1 ppm. Larutkan 10,0 g zat uji dalam 50,0 ml air, tambah 10,0 ml asam hidroklorida timah.
- **Asam sulfat.** Tidak lebih dari 4 ppm. Larutkan 2,5 g dengan 50 ml air, tambah 8 ml asam hidroklorida timah.
- **Asam tartrat.** Tidak lebih dari 1 ppm. Larutkan 10 g dalam 50 ml air, tambah 10 ml asam hidroklorida timah.
- **Belerang.** Tidak lebih dari 2 ppm. Panaskan 5,0 g zat uji dengan 50,0 ml air dan 5,0 ml amonia encer di atas penangas air selama 1 jam, saring, uapkan hasil saringan sampai kering. Dididihkan residu dengan 1 g natrium karbonat anhidrat dan 10,0 ml air, tambah dalam keadaan panas tetes demi tetes larutan brom sampai terbentuk warna campuran kuning. Tambah 5,0 ml asam hidroklorida, dididihkan perlahan lahan sampai brom hilang, tambah beberapa tetes larutan timah (II) klorida sampai residu brom hilang. Tambah 50,0 ml air dan 8,0 ml asam hidroklorida timah.
- **Besi dekstran injeksi.** Tidak lebih dari 2 ppm. Pada 5,75 g dalam labu dasar bulat leher panjang, tambah 10 ml air dan 10 ml asam nitrat dan panaskan sampai terjadi asap coklat kuat. Dinginkan, tambah 10,0 ml asam sulfat dan panaskan lagi sampai terjadi asap dengan menambahkan asam nitrat tetes demi tetes sampai oksidasi sempurna. Dinginkan, tambah 30 ml air, dididihkan sampai volume 20 ml. Dinginkan, encerkan dengan air sampai volume 30,0 ml. Gunakan sebagian larutan untuk uji batas arsen dan bagian lainnya untuk uji batas timbal. Dididihkan perlahan lahan 20,0 ml larutan sampai volume 15 ml, dinginkan, tambah 15,0 ml asam hidroklorida timah dan 3 ml larutan timah (II) klorida. Sulingkan 15 ml ke dalam 25 ml air. Pada sulingan, tambah beberapa tetes air brom, hilangkan kelebihan brom dengan beberapa tetes larutan timah (II) klorida, tambah 20,0 ml air. Gunakan 0,8 ml bercak standar.
- **Biru metilen.** Tidak lebih dari 8 ppm. Pada 5,0 g, lakukan seperti yang tertera pada hijau berlian, menggunakan 10,0 ml alikuot sebagai pengganti 20,0 ml. Tambah 5,0 ml air dan 10,0 ml asam hidroklorida timah. Sulingkan 20 ml, pada sulingan tambah 3 tetes larutan timah (II) klorida dan 40,0 ml air.
- **Gelatin.** Tidak lebih dari 2 ppm. Pada 5,0 g, tambah

10,0 ml air, biarkan selama 1 jam. Hangatkan sampai larut, tambah 10,0 ml asam klorida dan air brom sedikit berlebihan. Tambah 2,0 ml asam hidroklorida timah, refluks selama 1 jam, dinginkan, tambah 10,0 ml air dan 10,0 ml asam hidroklorida.

- **Gliserol.** Tidak lebih dari 2 ppm. Larutkan 5,0 g zat uji dengan 50,0 ml air, tambah 10,0 ml asam hidroklorida timah.
- **Glukosa.** Tidak lebih dari 1 ppm. Pada 10,0 g, lakukan seperti yang tertera pada asam sitrat.
- **Hijau berlian.** Tidak lebih dari 4 ppm. Larutkan 5,0 g dengan 200,0 ml air, dalam botol dasar bulat mulut lebar, tambah 15,0 ml asam nitrat, dididihkan sampai volume 20,0 ml. Biarkan dingin, tambah 10,0 ml asam sulfat, aduk. Dididihkan, tambah sedikit asam nitrat dan setiap penambahan selalu didinginkan lebih dulu, sampai larutan tak berwarna. Panaskan sampai terbentuk asap putih dan jika terjadi warna gelap, lanjutkan penambahan asam nitrat dan panaskan selama 1 jam. Dinginkan, tambah 25,0 ml larutan jenuh amonium oksalat, dididihkan sampai terjadi buih halus. Dinginkan, encerkan dengan air sampai volume 40,0 ml. Gunakan sebagian larutan untuk uji batas arsen dan bagian lain untuk uji batas timbal. Pada 20,0 ml larutan, tambah 10,0 ml asam hidroklorida timah, sulingkan 20 ml, pada sulingan tambah 3 tetes larutan timah (II) klorida dan 40 ml air.
- **Kalium hidroksida.** Tidak lebih dari 4 ppm. Larutkan 2,5 g dalam 50 ml air, tambah 15,0 ml asam hidroklorida, hilangkan kelebihan brom dengan penambahan beberapa tetes larutan timah (II) klorida.
- **Kalsium karbonat.** Tidak lebih dari 4 ppm. Larutkan 2,5 g dalam 15,0 ml asam hidroklorida brom dan 45,0 ml air. Tambah larutan timah (II) klorida sampai kelebihan brom hilang.
- **Kalsium laktat.** Tidak lebih dari 2 ppm. Larutkan 5 g zat uji dalam 50 ml air, tambah 12 ml asam klorida timah.
- **Kaolin.** Tidak lebih dari 2 ppm. Dispersikan 5 g zat uji dalam 50 ml air, tambah 10 ml asam hidroklorida timah.
- **Kristal violet.** Tidak lebih dari 4 ppm. Pada 5,0 g, lakukan seperti yang tertera pada hijau berlian.
- **Magnesium klorida.** Tidak lebih dari 2 ppm. Larutkan 5,0 g dalam 50,0 ml air, tambah 10,0 ml asam hidroklorida timah.
- **Magnesium sulfat.** Tidak lebih dari 4 ppm. Larutkan 2,5 g zat uji dalam 50,0 ml air, tambah 10,0 ml asam hidroklorida timah.
- **Manitol.** Tidak lebih dari 2 ppm. Larutkan 5,0 g dengan 50,0 ml air dan 10,0 ml asam hidroklorida timah.
- **Natrium asetat.** Tidak lebih dari 2 ppm. Larutkan 5,0 g dalam 50 ml air, tambah 15 ml asam hidroklorida timah.
- **Natrium hidroksida.** Tidak lebih dari 4 ppm. Larutkan 2,5 g dalam cawan porselen dengan 10,0

ml air, 1,25 ml asam hidroklorida brom. Tambah larutan timah (II) klorida sampai kelebihan brom hilang.

- **Natrium metabisulfit.** Tidak lebih dari 4 ppm. Larutkan 2,5 g dalam cawan porselen dengan 10,0 ml air, 1,25 g kalium klorat dan 16 ml asam hidroklorida, panaskan sampai klor hilang. Tambah larutan timah (II) klorida sampai klor hilang tambah 35,0 ml air.
- **Natrium salisilat.** Tidak lebih dari 2 ppm. Campur 5,0 g zat uji dengan 3,0 g natrium karbonat anhidrat dan 10,0 ml air brom, uapkan di atas penangas air sampai kering, pijarkan, dinginkan. Larutkan residu dalam campuran 16 ml asam hidroklorida brom dan 5 ml air brom. Tambah 40 ml air, dididihkan dengan hati hati sambil tambah air brom sampai tetap terdapat brom agar berlebihan selama pendidihan, saring, tambah larutan timah (II) klorida sampai kelebihan brom hilang.
- **Sorbitol.** Tidak lebih dari 1 ppm. Larutkan 10,0 g zat uji dengan 50,0 ml air, tambah 10 ml asam hidroklorida timah.

Besi

Peralatan

Gunakan tabung Nessler seperti yang tertera pada uji batas logam berat.

Pereaksi

- **Amonia.** Uapkan 5,0 ml amonia encer di atas penangas air sampai kering. Tambah 40,0 ml air, 2,0 ml asam sitrat (20% b/v) dan 2 tetes asam tioglikolat, aduk. Basakan dengan amonia encer, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml, tidak boleh terbentuk warna merah muda.
- **Asam hidroklorida.** Uapkan 5,0 ml di atas penangas air sampai hampir kering. Tambah 40,0 ml air, 2,0 ml asam sitrat (20% b/v) dan 2 tetes asam tioglikolat, aduk. Basakan dengan besi amonia, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml, tidak boleh terbentuk warna merah muda.
- **Asam sitrat.** Larutkan 500,0 mg dalam 40,0 ml air, tambah 2 tetes asam tioglikolat, aduk, basakan dengan amonia, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml, tidak terbentuk warna merah muda.
- **Larutan standar besi.** Larutkan besi (III) amonia sulfat dalam 100 ml air, tambah 5,0 ml asam hidroklorida encer dan air sampai batas volume 1000,0 ml. Setiap ml mengandung 1 µg Fe.
- **Larutan standar warna.** Encerkan 2,0 ml larutan standar besi dengan 40,0 ml air, tambah 2,0 ml asam sitrat (20% b/v) dan 2 tetes asam tioglikolat, aduk. Basakan dengan amonia, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml, biarkan selama 5 menit.
- **Larutan uji.** Kecuali dinyatakan lain, larutkan sejumlah zat uji dalam 35 ml air.

Pengujian

Pada larutan uji, tambah 2,0 ml asam sitrat (20% b/v) dan 2 tetes asam tioglikolat, aduk. Basakan dengan amonia, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml, biarkan selama 5 menit. Bandingkan warna larutan uji terhadap larutan standar warna; warna larutan uji tidak lebih kuat intensitas warnanya dibandingkan larutan standar.

Logam Berat

Pengujian ini dimaksudkan untuk menunjukkan batas cemaran logam yang masih diperbolehkan, yang diwarnai dengan ion sulfida. Pengujian dilakukan dengan membandingkan warna larutan uji terhadap warna larutan standar. Pengujian dilakukan dengan 3 prosedur berikut. Kecuali dinyatakan lain, pengujian dilakukan dengan prosedur I.

Prosedur I. Digunakan untuk zat yang larutannya jernih dan tidak berwarna.

Prosedur II. Digunakan untuk zat yang larutannya tidak jernih atau tidak berwarna, mengganggu pengendapan logam oleh ion sulfida atau untuk zat berupa minyak lemak atau minyak atsiri.

Prosedur III. Digunakan untuk zat yang jernih dan tidak berwarna dengan penambahan larutan natrium hidroksida encer.

Peralatan

Tabung Nessler adalah tabung yang dibuat dari kaca jernih, dasar datar dan transparan, kecuali dinyatakan lain. Kapasitas volume 50 ml, kecuali dinyatakan lain, cairan dalam tabung diamati dari atas ke bawah searah sumbu vertikal tabung menggunakan dasar putih atau jika perlu menggunakan dasar hitam.

Pereaksi.

- **Asam hidroklorida**
- **Larutan standar timbal (II) nitrat.** Larutkan 159,8 mg timbal (II)nitrat dalam 100 ml air yang telah ditambahkan 1 ml asam nitrat, encerkan dengan air sampai batas volume 1000,0 ml. Buat dan simpan larutan ini dalam wadah polietilena atau kaca, bebas dari garam timbal terlarut.
- **Larutan standar timbal.** Pada saat digunakan, encerkan 10,0 larutan standar timbal (II) nitrat dengan air sampai batas volume 100,0 ml. Setiap ml larutan standar timbal mengandung setara dengan 10 µg Pb. Larutan standar kontrol yang dibuat dengan 2,0 ml larutan standar timbal, jika dibandingkan terhadap larutan, menunjukkan 1,0 g zat uji setara dengan 0,002% Pb.

Prosedur I

Larutan standar. Pipet 2,0 ml larutan standar timbal ke dalam tabung Nessler, encerkan dengan air sampai batas volume 25,0 ml. Tambah asam asetat encer atau amonia encer sampai pH 3,0—4,0, encerkan dengan air sampai volume 35 ml, aduk.

Larutan uji. Ke dalam tabung Nessler, masukkan

25,0 ml larutan yang dibuat seperti yang tertera pada monografi, larutkan dan encerkan zat uji dengan air sampai batas volume 25,0 ml. Zat uji yang ditimbang (g), dihitung dengan rumus $2/1000 L$ dimana L adalah batas logam berat (%). Tambah asam asetat encer atau amonia encer sampai pH 3,0—4,0, encerkan dengan air sampai volume 35 ml, aduk.

Pengujian. Pada masing-masing larutan standar dan larutan uji, tambah 10 ml larutan hidrogensulfida segar, aduk, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml, biarkan selama 5 menit. Warna larutan uji tidak lebih kuat dari warna larutan standar.

Prosedur II

Larutan standar. Buat seperti yang tertera pada prosedur I.

Larutan uji. Kecuali dinyatakan lain, timbang dengan rumus $2/1000 L$ zat uji, masukkan ke dalam krus, tambah asam sulfat sampai menjadi asam. Pijarkan dengan hati hati pada suhu rendah sampai terbentuk arang sempurna. Tambah 2 ml asam nitrat dan 5 tetes asam sulfat, panaskan dengan hati hati sampai tidak ada lagi asap putih. Pijarkan dalam tanur pada suhu 500° - 600°C sampai arang terbakar sempurna, dinginkan. Tambah 4 ml asam hidroklorida (50% v/v), sumbat, hangatkan di atas penangas air selama 15 menit, buka sumbat, uapkan perlahan lahan di atas penangas air sampai kering. Basahi residu dengan 1 tetes asam hidroklorida, tambah 10 ml air panas, hangatkan di atas penangas air selama 2 menit. Tambah amonia encer tetes demi tetes sampai larutan tepat bereaksi alkali terhadap kertas lakmus, encerkan dengan air sampai batas volume 25,0 ml, tambah asam asetat encer sampai pH 3,0 - 4,0. Saring, bilas krus dan penyaring dengan 10 ml air, campur hasil saringan dan cairan bilasan dalam tabung Nessler, encerkan dengan air sampai volume 35,0 ml, aduk.

Pengujian. Lakukan pengujian seperti yang tertera pada prosedur 1.

Prosedur III

Larutan standar. Ke dalam tabung Nessler, pipet 2 ml larutan timbal standar (20 µg Pb), tambah 5 ml larutan natrium hidroksida encer dan encerkan dengan air sampai batas volume 50,ml, aduk.

Larutan uji. Ke dalam tabung Nessler, masukkan 25 ml larutan yang dibuat seperti yang tertera pada monografi, atau kecuali dinyatakan lain, larutkan dalam campuran 20 ml air dan 5 ml larutan natrium hidroksida encer, zat uji yang ditimbang dalam g, yang dihitung dengan rumus $2/100 L$ dimana L adalah batas logam berat (%). Encerkan dengan air secukupnya sampai 50,0 ml, aduk.

Prosedur. Pada masing-masing tabung mengandung larutan standar dan larutan uji, tambah 5 tetes larutan natrium sulfida, aduk, biarkan selama 5 menit. Warna larutan uji tidak lebih kuat dari warna larutan standar.

Timbal

Lakukan dengan salah satu prosedur berikut:

Prosedur I

Peralatan

Gunakan tabung Nessler seperti yang tertera pada uji batas logam berat.

Pereaksi

- **Amonia encer.** Pada 20,0 ml, tambah 1,0 ml larutan kalium sianida, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml, tambah 2 tetes larutan natrium sulfida, tidak terbentuk warna kehitaman.
- **Amonia asetat.** Larutkan 2,0 g dalam 25,0 ml air, tambah amonia encer sampai basa, tambah 1,0 ml larutan kalium sianida, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml. Tambah 2 tetes larutan natrium sulfida, tidak terbentuk warna kehitaman.
- **Amonium oksalat.** Larutkan 2,0 g dalam 25,0 ml air, tambah amonia encer sampai basa, tambah 1,0 ml larutan kalium sianida, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml. Tambah 2 tetes larutan natrium sulfida, tidak terbentuk warna kehitaman.
- **Asam asetat.** Didihkan 25,0 ml larutan sampai volume 15 ml, dinginkan, tambah amonia encer sampai basa, tambah 1,0 ml larutan kalium sianida, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml. Tambah 2 tetes larutan natrium sulfida, tidak terbentuk warna kehitaman.
- **Asam hidroklorida encer.** Encerkan 10,0 ml larutan dengan 10,0 ml air, tambah amonia encer sampai basa, tambah 1,0 ml larutan kalium sianida, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml. Tambah 2 tetes larutan natrium sulfida, tidak terbentuk warna kehitaman.
- **Asam nitrat berasap.** Memenuhi syarat seperti tertera pada asam nitrat.
- **Asam perklorat.** Memenuhi syarat berikut : Pekatkan 10,0 ml sampai volume 2,5 ml, encerkan dengan air sampai volume 20,0 ml. Tambah amonia encer sampai basa, tambah 1,0 ml larutan kalium sianida, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml. Tambah 2 tetes larutan natrium sulfida, tidak terbentuk warna kehitaman.
- **Asam sitrat.** Larutkan 10,0 g dalam 10,0 ml air, tambah amonia encer sampai basa, tambah 1,0 ml larutan kalium sianida, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml. Tambah 2 tetes larutan natrium sulfida, tidak terbentuk warna coklat kehitaman.
- **Asam sulfat.** Larutkan 5,0 g dalam 20,0 ml air, tambah amonia encer sampai basa, tambah 1,0 ml larutan kalium sianida, encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml. Tambah 2 tetes larutan natrium sulfida, tidak terbentuk warna coklat kehitaman.
- **Larutan ditizon (0,05% b/v dalam kloroform).** Larutan harus segar.
- **Larutan kalium sianida.** Larutkan 10,0 g kalium sianida dalam 90 ml air, tambah 2,0 ml larutan

hidrogen peroksida, biarkan selama 24 jam, tambah air sampai batas volume 100,0 ml. Larutan memenuhi syarat berikut : Campur 2,0 ml dengan 5,0 ml amonia encer dan 40,0 ml air, tambah 5,0 ml larutan timbal encer, tidak terbentuk warna coklat kehitaman.

- **Larutan natrium hidroksida.** Larutkan 159,8 mg timbal nitrat dalam 5 ml larutan asam nitrat. Encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml. Pembuatan dan penyimpanan dilakukan menggunakan wadah terbuat dari bahan bebas garam timbal terlarut.
- **Larutan timbal encer.** Encerkan 10,0 ml larutan timbal pekat dengan air sampai batas volume 100 ml. Larutan harus segar. Setiap ml larutan mengandung 10 µg Pb.

Pengujian

Sediakan larutan primer dan larutan pembantu seperti yang tertera pada larutan uji untuk masing-masing zat uji. Kecuali dinyatakan lain, larutan dibuat menggunakan air panas mengandung asam asetat yang sesuai, jika terbentuk karbon dioksida, hilangkan dengan pendidihan. Pada larutan pembantu, tambah larutan timbal encer seperti tertera pada larutan uji. Jika perlu masing-masing, tambah amonia encer sampai basa, tambah 1 ml larutan kalium sianida. Larutan hanya boleh beropalesensi lemah. Jika warna kedua larutan berbeda, warna harus disamakan dengan penambahan beberapa tetes larutan karamel yang sangat encer atau zat lain yang tidak bereaksi. Pada masing-masing larutan, tambah air sampai batas volume 50 ml, tambah 0,1 ml larutan natrium sulfida, kocok. Bandingkan warna dengan cara yang sesuai menggunakan latar belakang putih, jika warna larutan primer lebih kuat dari warna larutan pembantu, zat uji mengandung timbal yang jumlahnya melebihi batas yang diperbolehkan. Kadar timbal dalam zat uji dapat ditetapkan dengan menetapkan jumlah larutan timbal encer yang harus ditambahkan ke dalam larutan pembantu dan diencerkan dengan air sampai batas volume 50 ml, tambah 0,1 ml larutan natrium sulfida, warna kedua larutan sama. Jika diperlukan lebih dari 15 ml larutan timbal encer, pengujian harus diulangi menggunakan zat uji lebih sedikit.

Larutan uji

- **Asam nikotinat.** Batas tidak lebih dari 10 ppm.
Larutan primer. Larutkan 7 g dalam air panas secukupnya, basakan dengan amonia encer, tambah 5 ml asam asetat.
Larutan pembantu. Lakukan seperti pembuatan larutan primer menggunakan 2 g zat. Larutan timbal encer 5 ml.
- **Gliserol.** Batas tidak lebih dari 1 ppm.
Larutan primer. Larutkan 12 g dalam air panas secukupnya, tambah 5 ml asam asetat.
Larutan pembantu. Lakukan seperti cara pembuatan larutan primer menggunakan 2 g zat. Larutan timbal encer 1 ml.

- **Natrium hidroksida.** Batas tidak lebih dar 5 ppm.
Larutan primer. Larutkan 4 g dalam air panas secukupnya, tambah 20 ml asam asetat.
Larutan pembantu. Larutkan 2 g dalam air panas secukupnya, tambah 12 ml asam asetat. Larutan timbal encer 1 ml.
- **Natrium salisilat.** Batas tidak lebih dari 10 ppm.
Larutan primer. Larutkan 7 g dalam air panas secukupnya, basakan dengan amonia encer, tambah 12 ml asam asetat.
Larutan pembantu. Lakukan seperti cara pembuatan larutan primer menggunakan 2 g zat dan 7 ml asam asetat. Larutan timbal encer 5 ml.
- **Prokainamid hidroklorida.** Batas tidak lebih dari 5 ppm.
Larutan primer dan larutan pembantu. Larutkan dalam 45 ml air hangat dan tambah 1 g amonium asetat, masing-masing 3 g zat untuk larutan primer dan 1 g zat untuk larutan pembantu, tambah masing-masing 1 ml asam asetat. Larutan timbal encer 1 ml.
- **Sorbitol.** Batas tidak lebih dari 2 ppm.
Larutan primer. Larutkan 12 g dalam air panas secukupnya, tambah 5 ml asam asetat.
Larutan pembantu. Lakukan seperti pembuatan larutan primer menggunakan 2 g zat. Larutan timbal encer 2 ml.
- **Sulfadiazin.** Batas tidak lebih dari 10 ppm. Larutan timbal encer 1 ml.
- **Sulfadimetoksin.** Batas tidak lebih dari 10 ppm.
Larutan primer dan larutan pembantu. Lakukan seperti pembuatan yang tertera pada sulfadiazin. Larutan timbal encer 1 ml.
Larutan primer. Larutkan 2,0 g dalam campuran 7 ml larutan natrium hidroksida dan air. Larutan pembantu : Larutkan 1,0 g dalam campuran 7 ml larutan natrium hidroksida dan air.
- **Larutan standar ditizon.** Larutkan 10 mg ditizon dalam 1000 ml kloroform. Simpan larutan dalam botol bebas timbal bersumbat kaca, lindungi dari cahaya dan dalam lemari es.
- **Larutan hidroksilamin hidroklorida.** Larutkan 20 mg hidroksilamin hidroklorida dalam air sampai volume 65 ml. Pindahkan ke dalam labu pisah, tambah beberapa tetes larutan biru timol dan amonia sampai terbentuk warna kuning. Tambah beberapa tetes natrium dietilditiokarbamat (4% b/v), aduk, biarkan selama 5 menit. Ekstrak larutan tiap kali dengan 10—15 ml kloroform. Pada 5 ml ekstrak kloroform, jika dikocok dengan larutan tembaga (II) sulfat, tidak berwarna kuning. Tambah asam hidroklorida encer sampai terbentuk warna merah muda. Jika perlu, tambah 1 atau 2 tetes larutan biru timol dan encerkan dengan air sampai batas volume 100,0 ml.
- **Larutan kalium sianida.** Larutkan 50 g kalium sianida dalam air sampai batas volume 100,0 ml. Hilangkan timbal dengan mengekstrak menggunakan larutan ditizon seperti yang tertera pada larutan amonium sitrat kemudian ekstrak dengan kloroform. Encerkan larutan sianida dengan air sampai mengandung 10 µg/100 ml kalium sianida.
- **Larutan timbal.** Encerkan 10,0 ml larutan timbal (II) nitrat dengan air sampai volume 10,0 ml. Larutan harus segar. Setiap ml larutan timbal setara dengan 10 ug Pb. Larutan standar yang dibuat dengan 2,0 ml larutan timbal jika dibandingkan terhadap larutan yang mengandung 1,0 g zat uji, menunjukkan jumlah setara 20 ppm.
- **Larutan timbal (II) nitrat.** Larutkan 159,8 mg timbal (II) nitrat dalam 10 ml air yang telah ditambahkan 1 ml asam nitrat, encerkan dengan air sampai batas volume 1000,0 ml. Buat dan simpan larutan ini dalam wadah polietilen atau kaca yang bebas dari garam timbal terlarut.

Prosedur

Pindahkan ke dalam labu pisah sejumlah volume larutan uji seperti yang tertera pada masing-masing monografi dan kecuali dinyatakan lain, tambah 6 ml larutan amonium sitrat dan 2 ml larutan hidroksilamin hidroklorida. Untuk penetapan timbal dalam garam besi, gunakan 10 ml larutan amonium sitrat. Tambah 2 tetes larutan merah fenol dan amonia sampai basa. Jika perlu, dinginkan larutan, tambah 2 ml larutan kalium sianida. Ekstrak tiap kali dengan 5 ml larutan ditizon sampai terbentuk warna hijau, alirkan tiap ekstrak ke dalam labu pisah yang lain. Kocok larutan ditizon selama 30 detik dengan 20 ml asam nitrat (1% v/v) dan buang lapisan kloroform. Pada larutan asam, tambah 5,0 ml larutan standar ditizon dan 4 ml larutan amonium sianida, kocok selama 30 detik. Lapisan kloroform berwarna violet tidak lebih kuat dari warna larutan standar yang dibuat dengan volume larutan timbal encer setara dengan jumlah timbal yang diperbolehkan dalam zat uji dengan jumlah pereaksi dan prosedur yang sama.

Prosedur II

Simpan semua pereaksi dalam wadah kaca borosilikat. Bilas semua alat dengan asam nitrat encer (50% v/v) hangat, kemudian dengan air.

Pereaksi

- **Larutan amonium sianida.** Larutkan 2 g kalium sianida dalam 15 ml amonia, encerkan dengan air sampai batas volume 100,0 ml.
- **Larutan amonium sitrat.** Larutkan 40 g asam sitrat dalam 90 ml air. Tambah 2 tetes larutan merah fenol dan amonia dengan hati hati sampai terbentuk warna kemerahan. Hilangkan timbal yang ada dengan mengekstrak larutan tiap kali dengan 20 ml larutan ditizon sampai terbentuk warna hijau orange.
- **Larutan timbal encer.** Encerkan 10,0 ml larutan timbal dengan asam nitrat (1%v/v) sampai batas volume 100,0 ml. Larutan mengandung 1 µg/ml Pb.

Selenium

Larutan stok. Larutan 40,0 mg selenium dalam 10 ml asam nitrat 33% v/v, jika perlu panaskan dengan hati-hati di atas penangas air sampai larut, tambah air sampai batas volume 1000 ml, aduk. Pada 5,0 ml larutan, tambah air sampai batas volume 200,0 ml, aduk. Larutan mengandung 1 µg/ml.

Larutan standar. Pada 6,0 ml larutan stok, tambah 50 ml asam nitrat 1,67% v/v.

Larutan uji. Lakukan pembakaran seperti yang tertera pada pembakaran labu oksigen dan 25,0 ml larutan asam nitrat 33,3% v/v sebagai cairan penjerap. Setelah pembakaran selesai, tambah beberapa ml air di atas sumbat, buka sumbat dengan hati-hati. Bilas sumbat, kaca platina dan dinding gelas kimia dengan 25 ml air. Pindahkan larutan ke dalam gelas kimia 150 ml, panaskan dengan hati-hati sampai mendidih, biarkan mendidih selama 10 menit, dinginkan sampai suhu kamar.

Larutan blanko. Pada 50 ml larutan asam nitrat (1,67% v/v).

Prosedur

Larutan standar, larutan uji dan larutan blanko disiapkan secara bersamaan sebagai berikut: Pada masing-masing larutan, tambah larutan amonia (33% v/v) sampai pH 2,0. Tambah 200 ml hidrosilamin hidroklorida, kocok perlahan-lahan sampai larut, tambah 5,0 ml larutan diaminofalein, aduk. Sumbat gelas dengan kaca arloji, biarkan pada suhu kamar selama 100 menit. Pindahkan larutan ke dalam labu pisah, bilas gelas dengan 10 ml air. Ekstrak dengan 5,0 ml sikloheksan, kocok selama 2 menit, biarkan terpisah, buang lapisan air. Sentrifus ekstrak sikloheksan untuk memisahkan residu air. Ukur maksimum serapan pada panjang gelombang 380 nm, gunakan sikloheksan yang diperoleh dari larutan blanko sebagai blanko, jika digunakan 200,0 mg zat uji, serapan larutan uji tidak lebih besar dari serapan larutan standar, jika digunakan 100,0 mg zat uji, serapan larutan uji tidak lebih besar dari setengah serapan larutan standar.

Klorida

Peralatan

Tabung Nessler seperti yang tertera pada uji batas logam berat. Standar opalesensi. Pipet 1,0 ml asam hidroklorida 0,01 M dan 10,0 ml asam nitrat encer. Encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml, tambah 10,0 ml larutan perak nitrat, aduk, biarkan selama 5 menit.

Prosedur

Larutkan zat uji dalam air atau buat larutan uji seperti yang tertera pada masing-masing monografi, masukkan ke dalam tabung Nessler. Tambah 10,0 ml asam nitrat encer, kecuali jika pada pembuatan larutan uji telah ditambahkan asam nitrat. Encerkan dengan air sampai batas volume 50,0 ml, tambah 1,0 ml larutan perak nitrat, aduk, biarkan selama 5 menit. Opalesensi

yang terbentuk tidak lebih kuat dari opalesensi standar. Amati dengan arah tegak lurus terhadap tabung.

Sulfat

Peralatan

Gunakan tabung Nessler seperti yang tertera pada uji batas logam berat.

Pereaksi

- **Suspensi barium sulfat.** Campur 15,0 ml barium klorida 0,5 M, 55,0 ml air dan 20,0 ml etanol (95%) bebas sulfat. Tambah 5,0 ml larutan kalium sulfat (0,0181% b/v), encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml, aduk. Larutan harus segar.
- **Barium klorida 0,5 M.** Larutkan 122,1 g barium klorida dalam air sampai batas volume 1000 ml.
- **Etanol (95%) bebas sulfat.** Memenuhi syarat berikut: Uapkan 25 ml etanol (95%) sampai volume 2 ml. Sisa memenuhi uji batas sulfat dengan standar opalesensi menggunakan campuran 2,0 ml asam hidroklorida encer dan 43,0 ml air yang mengandung 5,0 ml suspensi barium sulfat.
- **Standar opalesensi.** Pipet 1,25 ml asam sulfat 0,01 M dan 2,0 ml asam hidroklorida encer ke dalam tabung Nessler. Encerkan dengan air sampai volume 45,0 ml, tambah 5,0 ml suspensi barium sulfat, aduk, biarkan selama 5 menit.
- **Larutan uji.** Kecuali dinyatakan lain, dibuat dengan melarutkan zat uji ke dalam air.

Pengujian

Masukkan larutan uji ke dalam tabung Nessler, tambah 2,0 ml asam hidroklorida encer, kecuali jika pada pembuatan larutan uji telah digunakan asam hidroklorida. Encerkan dengan air sampai volume 45,0 ml, tambah 5,0 ml suspensi barium sulfat, aduk, biarkan selama 5 menit. Amati dengan arah tegak lurus terhadap tabung, opalesensi yang terbentuk tidak lebih kuat dari standar opalesensi.

Uji Keamanan Hayati

Uji Sterilitas

Pengujian dilakukan dengan cara yang dirancang untuk menjamin tidak terjadinya kontaminasi mikroba. Untuk sediaan yang disterilkan dalam otoklaf pada suhu di atas 121°C, jumlah contoh yang digunakan dapat dikurangi. Jika isi tiap wadah 250 ml atau lebih, jumlah contoh yang digunakan dapat dikurangi menjadi 3. Jika isi tiap wadah kurang dari 1 ml cairan atau kurang dari 50 mg zat padat, jumlah contoh yang digunakan adalah 2 kali jumlah yang tertera pada tabel di bawah.

Kecuali dinyatakan lain, gunakan jumlah contoh yang akan diuji, seperti yang tertera pada tabel di bawah ini: