

Analisis Kualitatif Vitamin B₁ Pada Kacang Hijau (*Phaseolus radiates* L.) Menggunakan Metode Konvensional dan KLTKT Silika Gel 60 F254

Ridho Asra^{1*}, Boy Chandra¹, Zulharmita¹, Elsa Febrianti¹

¹Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM), Padang, Indonesia

*E-mail: ridhoasra@gmail.com

Abstrak

Telah dilakukan penelitian mengenai analisis kualitatif vitamin B₁ pada kacang hijau dengan menggunakan metode konvensional dan kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (KLTKT). Analisis kualitatif dilakukan dengan metode konvensional menggunakan pereaksi warna dan menggunakan plat KLTKT silika gel 60 F₂₅₄ dengan fase gerak metanol: air: asam asetat: ammonia (5: 4,5: 0,5: 0,75). Hasil analisis menggunakan pereaksi tiokrom, diazotasi, dan timbal asetat memberikan hasil yang positif terhadap vitamin B₁. Hasil analisis menggunakan KLTKT memberikan nilai R_f yang sama pada larutan sampel dan standar dengan R_f 0,5. Dari hasil penelitian menunjukkan sampel kacang hijau positif mengandung vitamin B₁.

Kata Kunci: Kacang Hijau; KLTLT; Vitamin B₁.

Abstract

A research has been conducted on qualitative analysis of vitamin B₁ on mung beans using conventional methods and highperformance thin layer chromatography (HPTLC). Qualitative analysis was carried out using conventional methods using color reagents and using a silica gel 60 F₂₅₄HPTLC plate with a mobile phase of methanol: water: acetic acid: ammonia (5: 4,5: 0,5: 0,75). The results of the analysis using tiochrome, diazotisation, and lead acetate reagents gave positive results for vitamin B₁. The results of the analysis using HPTLC give the same R_f value in the sample solution and standard with R_f 0.5. From the results of the study showed samples of green beans were positive for vitamin B₁.

Keywords: Mung Beans; HPTLC; Vitamin B₁.

PENDAHULUAN

Vitamin merupakan suatu molekul organik yang sangat diperlukan oleh tubuh untuk proses metabolisme dan pertumbuhan yang normal (Proverawati & Wati, 2011). Vitamin kebanyakan tidak dapat disintesis oleh tubuh, walaupun ada beberapa vitamin yang dapat disintesa di dalam tubuh, namun kecepatan pembentukannya sangat kecil, sehingga jumlah vitamin yang terbentuk tidak dapat memenuhi jumlah vitamin yang dibutuhkan tubuh. Oleh karena itu tubuh harus tetap memperoleh asupan vitamin dari luar yaitu dari makanan yang dikonsumsi dalam kehidupan sehari – hari (Mutschler, 1991).

Berdasarkan kelarutannya vitamin dibagi dalam kelompok vitamin yang larut air dan vitamin yang tidak larut air (tetapi larut dalam lemak). Vitamin yang larut lemak adalah vitamin A, D, E, dan K dan vitamin

yang larut air adalah vitamin C dan vitamin B kompleks seperti tiamin (B₁), riboflavin (B₂), niasin (B₃) atau (asam nikotinat, niasinamida), asam pantotenat (B₅), piridoksin (B₆), biotin (B₇), asam folat (B₉), dan kobalamin (B₁₂) (Deman, 1997).

Tiamin hidroklorida adalah bentuk murni dari vitamin B₁. Tiamin merupakan salah satu vitamin yang dibutuhkan untuk menambahkan nafsu makan, membantu penggunaan karbohidrat dalam tubuh dan sangat berperan dalam sistem syaraf. Sayuran dan buah-buahan mengandung sedikit vitamin B₁ sedangkan pada biji-bijian banyak mengandung vitamin B₁ salah satunya adalah kacang hijau (Andarwulan & Koswara, 1992).

Kacang hijau (*Phaseolus radiates* L.) adalah sejenis tanaman budidaya yang dikenal luas di daerah tropis. Kacang hijau mengandung vitamin B₁ yang berguna untuk

pertumbuhan dan mengandung protein yang cukup tinggi yang berfungsi mengganti sel mati dan membantu pertumbuhan sel tubuh serta merupakan sumber mineral penting yang bermanfaat untuk pertumbuhan tulang (Rukmana, 1997).

Berdasarkan pentingnya vitamin B₁ bagi tubuh, peneliti tertarik untuk menganalisis vitamin B₁ pada kacang hijau. Pada penelitian ini, analisis vitamin B₁ dilakukan dengan menggunakan dua metode yang berbeda yaitu, metode konvensional menggunakan pereaksi warna dan menggunakan KLTKT. Pada metoda kromatografi lapis tipis kinerja tinggimenggunakan plat silika gel 60 F₂₅₄ karena memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi.

METODE

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah UV Lamp 254 nm (Camag), bejana pengembang (Camag), timbang analitik (Precisa XB 220A), pH meter, blender, dan alat – alat gelas kimia yang menunjang penelitian. Bahan yang digunakan yaitu kacang hijau (*Phaseolus radiates* L.), Vitamin B₁ murni (PT Indofarma), polyvinyl alkohol (Merck), biru bromtimol (Merck), ammonium hidroksida (NH₄OH) (Merck), ammonium klorida (NH₄Cl) (Merck), metanol (CH₃OH) (Merck), asam asetat (CH₃COOH), amonia (NH₃) (Merck), kalium heksaianoferat (K₃[Fe(CN)₆]) (Merck), timbal asetat (Pb[C₂H₃O₂]₃) (Merck), aquadest (H₂O) (PT Brataco), natrium hidroksida (NaOH) (PT. Brataco), n-butanol (Merck), natrium nirit (NaNO₂) (PT Brataco), 2-naftol, kertas saring dan plat KLTKT Silika Gel 60 F₂₅₄ (Merck).

Prosedur Kerja

Pembuatan Reagen dan Larutan

a. Polivinyl alkohol 1 %

Larutkan 1 g polyvinyl alkohol dalam 100 mL aquadest (Kementerian Kesehatan RI, 2014).

b. Biru bromotimol 0,05 %

50 mg biru bromotimol dilarutkan dengan alkohol 40 % dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas homogenkan (Kementerian Kesehatan RI, 2014).

c. Pembuatan larutan dapar

Pipet larutan NH₄Cl 0,2 M sebanyak 49 mL dan larutan NH₄OH 0,2 M sebanyak 1 mL masukkan ke dalam Erlenmeyer kemudian ukur pH 7,6 (Andayani, et al., 2011).

d. NH₄Cl 0,2 M

1,0698 g NH₄Cl masukkan dalam labu ukur 100 mL, larutkan dengan aquadest cukupkan sampai tanda batas.

e. NH₄OH 0,2 M

0,13 mL NH₄OH masukkan dalam labu ukur 10 mL larutkan dengan aquadest cukupkan sampai tanda batas.

f. Natrium Hidroksida (NaOH) 1N

Timbang NaOH sebanyak 4 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu 100 mL tambahkan aquadest sampai tanda batas (Kementerian Kesehatan RI, 2014).

g. Asam Klorida (HCl) 3 N

Masukkan 5 mL aquadest ke dalam labu ukur 10 mL ditambahkan 2,5 mL HCl 12 N, kemudian dicukupkan dengan aquadest sampai tanda batas (Kementerian Kesehatan RI, 2014).

h. Kalium heksasianoferat (III) 5 %

Larutkan 5 g kalium heksasianoferat dengan aquadest sampai tanda batas 100 mL kemudian aduk homogen (Auterhoff & Kovar, 1987).

i. Timbal (II) Asetat

Timbang 10gram timbal (II) asetat masukkan ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan aquadest sampai tanda batas kemudian aduk homogen (Auterhoff & Kovar, 1987).

j. Pereaksi Diazotasi

-Diazo 1: timbang 10gram natrium nitrit masukkan ke dalam labu ukur 100 mL dengan aquadest sampai tanda batas.

-Diazo 2: timbang 0,25 gram 2-naftol dilarutkan ke dalam 100 mL NaOH 3 N (Auterhoff & Kovar, 1987).

Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah kacang hijau yang didapatkan di Pasar Raya Padang. Sebanyak 100 gram sampel kacang hijau dihaluskan dengan menggunakan alat blender

Persiapan Larutan Uji

Kacang hijau yang sudah dihaluskan, ditimbang sebanyak 5 gram, masukkan sampel ke dalam Erlenmeyer 100 mL, tambahkan 20 mL aquadest, lalu campuran diaduk menggunakan vortex mixer dan tambahkan 30 mL metanol, kemudian larutan disaring, filtrat diambil sebanyak 25 mL kemudian lakukan identifikasi (Zebua, 2016).

Identifikasi dengan Uji Reaksi Warna

a. Reaksi Tiokrom

Sebanyak 10 mL larutan uji dan larutan baku pembanding ditambahkan 3 mL NaOH 1 N, 2 tetes kalium heksasianoferat (III) 5 % yang dibuat segar dan 5 mL n-butanol, kemudian kocok kuat selama beberapa menit. Setelah terpisah larutan uji dan larutan pembanding akan berfluoresensi biru ungu.

b. Reaksi Timbal Asetat

Sebanyak 10 mL larutan uji dan larutan baku pembanding ditambahkan 1 mL larutan Pb (II) asetat 10 % dan 2 mL NaOH 6 N, segera terbentuk endapan warna kuning.

c. Reaksi Diazo (Pemeriksaan Amin Aromatik Primer)

Sebanyak 50 mg zat dilarutkan dalam 1 mL HCl 3 N, kemudian larutan direaksikan dengan 2 tetes pereaksi diazo I, kemudian dituangkan kedalam 2 mL pereaksi diazo II, terbentuk endapan warna merah jingga (Auterhoff & Kovar, 1987).

Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis

Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan untuk identifikasi vitamin B1 adalah metanol: air: asam asetat: amonia dengan perbandingan (5: 4,5: 0,5: 0,75).

Penjenuhan Chamber dan penyiapan Plat

Chamber disiapkan dengan cara diberi fase gerak metanol: air: asam asetat: amonia dengan perbandingan (5: 4,5: 0,5: 0,75), kemudian dijenuhkan dengan cara memasukkan kertas saring kedalam chamber, tunggu sampai kertas saring sampai basah seluruhnya. Plat yang digunakan adalah silika gel 60 F254 dengan ukuran 7 x 4 cm dengan jarak batas atas dan batas bawah masing-masing 1 cm.

Identifikasi Vitamin B1 dengan KLTKT

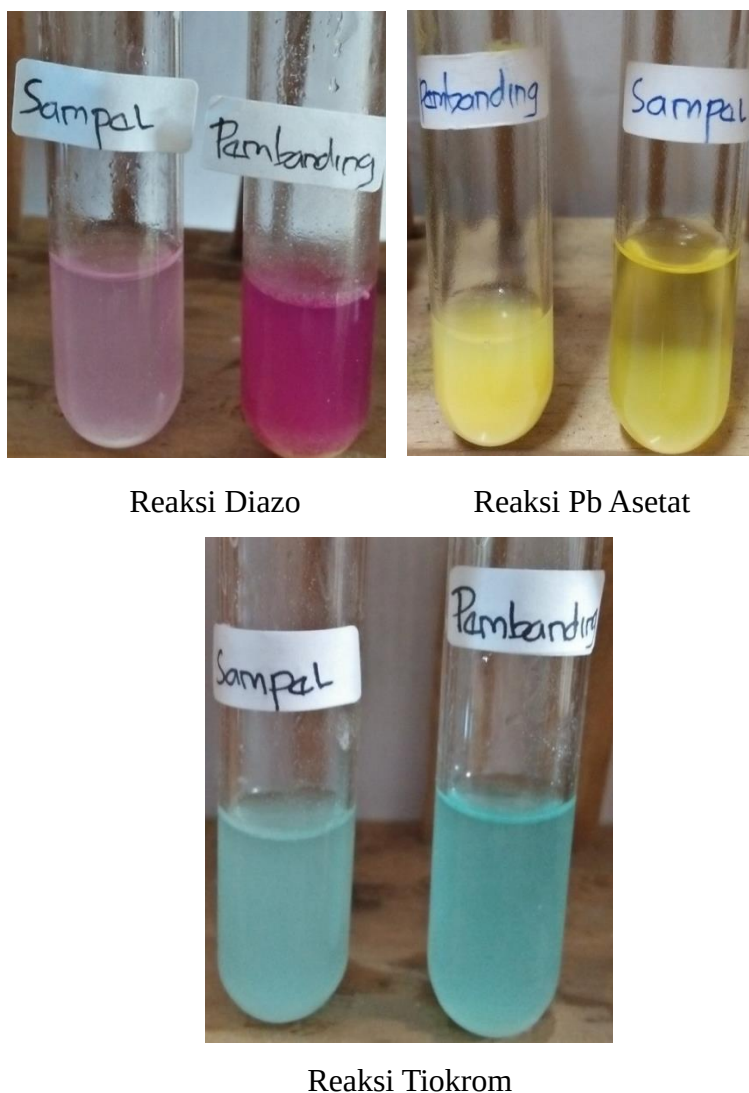
Larutan pembanding dan larutan uji ditotolkan sebanyak 2 μ L pada plat yang sudah disiapkan, kembangkan plat KLTKT di dalam chamber sampai fase gerak mencapai batas atas. Keluarkan plat dan kering anginkan diudara, kemudian amati bercak di bawah sinar UV 254 nm. Bila tinggi bercak larutan uji sama dengan bercak larutan pembanding, dan bila nilai Rf bercak larutan uji sama dengan nilai Rf bercak larutan pembanding, maka dapat dikatakan bahwa larutan uji mengandung vitamin B1 (Zebua, 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan analisis vitamin B1 yang terdapat pada kacang hijau yang terdapat di Pasar Raya Padang, dengan tujuan untuk mengetahui apakah didalam kacang hijau terkandung vitamin B₁. Sampel terlebih dahulu dipisahkan dari pengotor, sebanyak 100 g kacang hijau dihaluskan menggunakan blender. 5 g sampel kemudian dimasukan ke dalam Erlenmeyer 100 mL dan ditambahkan dengan 20 mL aquadest, kemudian diaduk selama 2 menit dengan menggunakan vortex mixer, setelah itu ditambahkan pelarut metanol sebanyak 30 mL. Tujuan penambahan metanol dikarenakan vitamin B₁ mudah larut terhadap metanol dan memudahkan untuk mengidentifikasi sampel menggunakan KLTKT karena titik didih metanol yang lebih rendah dibandingkan dengan air. Kemudian larutan tersebut disaring dan filtrat dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL.

Identifikasi vitamin B₁ pada larutan sampel dapat dilakukan dengan menggunakan reaksi warna diantaranya reaksi tiokrom, reaksi timbal asetat dan reaksi diazotasi. Dari hasil yang didapatkan pada reaksi tiokrom larutan sampel berflouresensi biru ungu, identifikasi dengan reaksi timbal asetat terbentuk endapan berwarna kuning, identifikasi dengan

reaksi diazotasi terbentuk endapan dan larutan berwarna merah jingga. Berdasarkan hasil identifikasi dengan reaksi warna yang telah dilakukan sesuai dengan yang tertera pada literatur (Auterhooff & Kovar, 1987), membuktikan bahwa larutan sampel kacang hijau mengandung vitamin B₁, hasil analisis dapat dilihat pada gambar 1 dan Tabel 1.



Gambar 1. Hasil uji reksai warna vitamin B1 dan kacang hijau

Untuk uji lanjut, identifikasi vitamin B₁ pada sampel dapat digunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (KLTKT). Menurut Farmakope Indonesia edisi V, identifikasi pendahuluan terhadap suatu sampel harus dilakukan dengan menggunakan zat pembanding kimia. Dalam

hal ini dibuat 3 totolan pada satu plat KLTKT, yaitu larutan pembanding vitamin B₁, larutan sampel kacang hijau dan larutan pembanding + larutan sampel. Hasil dari uji kualitatif menggunakan KLT memberikan bercak yang sama tinggi dan setelah dilakukan pengukuran maka didapatkan nilai

Rf yang sama pada ketiga bercak yaitu 0,5. Jadi dapat disimpulkan bahwa sampel kacang

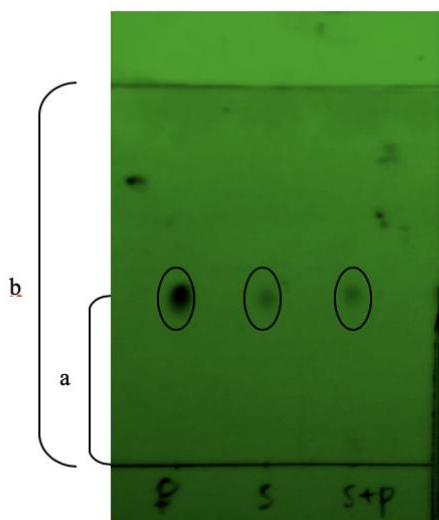
hijau yang diuji mengandung vitamin B₁. Hasil KLTKT dapat dilihat pada gambar 2.

Tabel 1. Data hasil uji reaksi warna vitamin B₁ pada kacang hijau

No	Reaksi	Persyaratan (Auterhooff & Kovar, 1987)	Pengamatan Sampel	Hasil
1	Tiokrom	Larutan biru ungu	Larutan biru ungu	+
2	Diazotasi	Endapan, larutan warna merah jingga	Endapan, larutan merah jingga	+
3	Timbal Asetat	Endapan warna kuning	Endapan warna kuning	+

Metode KLTKT digunakan plat silika gel 60 F254 karena memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi. Penotolan dilakukan secara manual dengan menggunakan pipa kapiler dengan ukuran volume 2 μ L. Bercak penotolan harus diusahakan sekecil mungkin dan penotolan harus hati-hati agar lapisan penyerap tidak rusak. Bila sampel telah ditotolkan maka langkah selanjutnya adalah mengembangkan sampel dalam bejana kromatografi yang terlebih dahulu dijenuhkan dengan uap fase gerak. Tepi

bagian bawah lempeng tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan ke dalam fase gerak kurang lebih 0,5 - 1 cm. Fase gerak yang digunakan pada pemisahan ini yaitu metanol; air; asam asetat; amoniak dengan perbandingan (5; 4,5; 0,5; 0,75), alasan penggunaan kombinasi pelarut karena dengan menggunakan kombinasi pelarut diatas memberikan pemisahan senyawa yang lebih baik serta memberikan hasil tinggi bercak dan nilai Rf yang sama yaitu 0,5 cm (Zebua, 2016).



Keterangan: a = Jarak tempuh noda
b = Jarak tempu pelarut
P = pembanding
S + P = sampel + pembanding
S = sampel

Gambar 2. Identifikasi vitamin B₁ menggunakan plat silika gel 60 F₂₅₄

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan

bahwa kacang hijau (*Phaseolus radiates*L.) positif mengandung vitamin B₁. Hasil positif menggunakan kedua metode konvensional dengan pereaksi warna dan

menggunakan KLTKT.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) Direktorat Jendral Penguatan Riset dan Pengembangan Kemenristek-Dikti yang telah membiayai Penelitian Dosen Pemula (PDP).

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, A. P. (2016). *Penetapan kadar vitamin B1 pada kacang hijau dan tempe yang beredar di pasar raya Padang secara spektrofotometri visibel*. (Skripsi). Padang: Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang.
- Almatsier, S. (2001). *Prinsip dasar ilmu gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Andarwulan, N., & Koswara, S. (1992). *Kimia vitamin*. Jakarta: Rajawali.
- Andayani, R., Harun, S., & Maya, V. K. (2011). Penetapan kadar vitamin B1 pada beras merah tumbuk, beras merah giling, dan berasputih giling secara spektrofotometer uv- visibel. *J Scient* 1 (2), 7 – 11.
- Autherhoff, H., & Kovar, K. A. (1987). *Identifikasi obat*. (Edisi IV). Penerjemah: N. C. Sugiarto. Bandung: Penerbit ITB.
- Dachriyanus. (2004). *Analisis struktur senyawa organik*. Padang: Andalas University Press.
- Day, R. A., & Underwood, A. L. (2002). *Analisis kimia kualitatif* (Edisi VI). Jakarta: Erlangga.
- Demam, J. M. (1997). *Kimia makanan*. Penerjemah: K. Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Departemen Gizi dan Kesehatan Masyarakat. (2007). *Gizi dan kesehatan masyarakat*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Dewoto, H. R. (2007). Vitamin dan mineral. In S. G. Gunawan (Edisi V). *Farmakologi dan terapi* (pp.769-793). Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik.
- Djamil, R. (2010). *Kimia bahan alam: Prinsip-prinsip dasar isolasi dan identifikasi*. Padang: Universitas Baiturrahman.
- Fitriyasti, B. (2010). *Kimia organik*. Padang: Universitas Baiturrahman.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2012). *Kimia farmasi analisis*. (Cetakan IX). Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gritter, R. J., dkk. (1991). *Pengantar kromatografi*. Penerjemah: K. Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Jones, D. S. (2010). *Statistik farmasi*. Penerjemah: H. U. Ramadaniati & H. Rivai. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2010). *Suplemen 1 farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Indonesia.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2014). *Farmakope Indonesia*. (Edisi V). Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Laksmiwati, A. A. I. M., Ratnayani, K., & Agustin, N. W. (2012). Kadar tiamin hidroklorida (vitamin B1) pada nasi beras putih dan beras merah pada berbagai waktu penyimpana pada alat magic-com. *Jurnal kimia*. 6 (1),47-54.
- Liu, S., Zuhuyuan, Z., Qin, L., Hongqun, L., & Wenxzu, Z. (2002). Spectrophotometric determination of vitamin B1 in a pharmaceutical formulation using tryphenyl acid dyes. *J Pharma Biomed Anal*, 30 (3), 665 - 94.
- Mutschler, E. (1991). *Dinamika obat*. (Edisi V). Penerjemah : Widiyanto, M.B dan Rianti, A.S : Bandung: Penerbit ITB.
- Nuraini, D. N. (2011). *Aneka manfaat biji-bijian (Edisi I)*. Yogyakarta: Gava Media.
- Proverawati, A., & Wati, E. K. (2011). *Ilmu gizi untuk keperawatan dan gizi kesehatan*. Yogyakarta: Nuha Medika.
- Purwati, H. (2013). *Kadar protein dan vitamin B1 dadih formula susu kacang hijau dan susu sapi yang berbeda dengan aroma mangga kweni*. (skripsi). Surakarta: Fakultas keguruan dan ilmu pendidikan Universitas Muhammad Surakarta.
- Purwono & Hartono, R. (2005). *Budidaya kacang hijau*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rohman, A. (2009). *Kromatografi untuk analisis obat*. (Edisi I). Yogyakarta: Graha Ilmu
- Rukmana, R. (1997). *Budi daya dan pascapanen kacang hijau*. Yogyakarta: Kanisius.
- Scott, R. P. W. (1993). *Chromatography silica gel and bonded phases*. Chichester: John Wiley and Sons Inc.

- Stahl, E. (1985). *Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi*. Penerjemah: K. Padmawinata., & I. Soediro. Bandung: Penerbit ITB.
- Watson, D. G. (1999). *Analisis farmasis buku ajar untuk mahasiswa farmasi dan praktisi kimia farmasi*. (Edisi II). Penerjemah: Winny. R. Syarief. Jakarta: EGC.
- Zebua, S. (2016). *Evaluasi penggunaan plat kromatografi lapis tipis silika gel GF 60 dan plat kromatografi lapis tipis silika gel 60 F254 pada penentuan kadar vitamin B1 pada beras putih*. (Skripsi). Padang: Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang.