

PROSIDING
SEMINAR
TAHUNAN
MAKSI

ISBN: 978-602-14669-0-2

PENGUATAN
PENELITIAN &
PENGEMBANGAN
INDUSTRI
KELAPA SAWIT
YANG BERKELANJUTAN

Editor:
Jono M. Munandar
Muhammad Nakhjib
Dede Saputra
Iman Sulaeman
Elviana

VALIDASI METODE ANALISIS BETA KAROTEN DENGAN HPLC-MWD PADA MATRIKS SAMPEL MINYAK SAWIT

Hanifah Nuryani LIOE¹, Siti WARNASIH^{1,2}, SUTANTO²

¹Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, PO Box 220 Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

²Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Jalan Pakuan PO Box 452 Bogor

ABSTRAK

Metode analisis beta karoten menurut AOAC OM No. 970.64 tahun 1999 telah dimodifikasi dari penentuan menggunakan spektrofotometer menjadi penentuan menggunakan instrumen HPLC-MWD dengan metode persiapan sampel yang hampir sama. Metode analisis yang dimodifikasi tersebut divalidasi dalam penelitian ini dengan menggunakan sampel minyak sawit. Validasi meliputi uji unjuk kerja instrumen dengan menggunakan larutan standar beta karoten 10 µg/mL (meliputi presisi, linearitas, limit deteksi/LOD dan limit kuantifikasi/LOQ instrumen), uji metode analisis dengan parameter akurasi, presisi (ripitabilitas dan intralab reproduksibilitas), linearitas dan limit deteksi metode. Dalam tahap preparasi sampel, minyak sawit disaponifikasi dengan KOH-metanol 10% kemudian diekstrak beta karotennya dengan solven petroleum eter. Penentuan dengan HPLC-MWD yang diset pada panjang gelombang 452 nm dilakukan setelah hasil ekstraksi dikeringkan dengan gas nitrogen dan kemudian dilarutkan dalam solven fase gerak HPLC (asetonitril 65% + isopropanol 35%) tepat 1 mL. Unjuk kerja instrumen menunjukkan presisi kromatografi yang memenuhi ketentuan JECFA (2006) yaitu kurang dari 2,0%, linearitas instrumen dengan koefisien determinasi R^2 0,999, serta LOD dan LOQ instrumen masing-masing 0,39 dan 1,30 µg/mL. Validasi metode analisis dengan menggunakan matriks sampel mempunyai akurasi 90-91% dan presisi 4,2 – 5,3% pada kisaran konsentrasi beta karoten 150 – 900 µg/g minyak sawit. Linearitas metode analisis menunjukkan koefisien determinasi R^2 lebih dari 0,990 pada kisaran konsentrasi tersebut dengan limit deteksi metode 7,2 µg/g sampel. Uji intralab reproduksibilitas menunjukkan nilai 3,0%, hasil ini memenuhi kriteria keberterimaan AOAC PVM (1993).

Kata kunci: analisis beta karoten, minyak sawit, HPLC-MWD, validasi metode, ekstraksi sampel

PENDAHULUAN

Beta karoten terkandung secara alami dalam minyak sawit yang diproses dari mesokarp buah kelapa sawit, terutama dalam *crude palm oil* dan *red palm oil*. Kandungan karotenoid minyak sawit ini dapat mencapai 500 hingga 700 ppm atau mg/kg dengan komponen utama alfa dan beta karoten (Chiu et al., 2009). Di tingkat konsumen, minyak sawit dikenal sebagai minyak goreng yang memiliki warna kuning jernih hingga kuning keemasan, disebabkan *crude palm oil* telah mengalami perlakuan lebih lanjut berupa pemurnian, pemucatan, deodorisasi dan fraksinasi.

Analisis beta karoten umumnya dilakukan dengan instrumen HPLC (Barba et al., 2006; Burns et al., 2003; Chiu et al., 2009; Lin dan Chen, 2003; Mortensen, 2005; Samaniego-Sánchez et al., 2010; Silva et al., 2011) baik dengan detektor UV-Vis, *photodiode array* maupun *mass spectrometer*, akan tetapi metode standard AOAC tahun 1999 menunjukkan analisis beta karoten dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis dengan persiapan sampel yang meliputi proses pemisahan beta karoten dari matriks dengan cara saponifikasi diikuti dengan pemisahan menggunakan kromatografi kolom. Metode AOAC tersebut tidak efektif dan efisien karena memerlukan waktu yang cukup lama dan alat tambahan berupa kolom kromatografi. Analisis beta karoten menggunakan HPLC lebih efisien dibandingkan dengan spektrofotometer karena tidak memerlukan proses pemisahan menggunakan kromatografi kolom dalam persiapan sampelnya, sebaliknya beta karoten dari matriks cukup disaponifikasi saja. Oleh karena itu metode analisis yang dikembangkan pada penelitian ini adalah metode menggunakan HPLC dengan detektor UV-Vis yang umum terdapat dalam laboratorium pengujian di Indonesia, dengan menggunakan kolom fase terbalik C18 dan fase gerak campuran asetonitril dan isopropanol (65% + 35%). Metode preparasi sampel yaitu saponifikasi dalam penelitian ini dilakukan berdasarkan pada metode AOAC (1999). Dengan demikian, validasi metode analisis beta karoten hasil modifikasi metode standard AOAC tersebut perlu dilakukan.

Validasi metode adalah sebuah proses yang penting dari program jaminan mutu hasil uji dimana sifat-sifat dari sebuah metode ditentukan dan dievaluasi secara obyektif (Garfield et al., 2000). Dengan adanya validasi ini, dapat diketahui suatu metode layak atau tidak untuk digunakan. Terdapat banyak metode yang divalidasi oleh organisasi-organisasi standar. Beberapa metode harus digunakan karena metode-metode tersebut sudah terstandar. Sebagai prosedur yang umum, metode standar yang diaplikasikan untuk jenis sampel tertentu, tidak perlu divalidasi sebelum digunakan. Penelitian ini bertujuan melakukan validasi metode analisis beta karoten dengan menggunakan HPLC dan matriks sampel sawit berdasarkan pada metode validasi EURACHEM tahun 1998 dengan parameter presisi instrumen, akurasi dan presisi metode yang ditentukan dari uji rekoveri, linearitas metode, limit deteksi metode dan reproduibilitas intralab.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Sampel yang digunakan adalah minyak goreng sawit yang dibeli dari pasar di Bogor dan minyak sawit merah dari perusahaan tertentu. Bahan-bahan kimia yang dipakai adalah standar beta karoten (kualitas p.a. dari Merck), asetonitril (HPLC-grade, Merck), isopropanol (HPLC-grade, Merck), gas nitrogen (teknis), metanol (p.a, Merck), petroleum eter (p.a, Merck), air suling, kalium hidroksida (p.a, Merck), natrium sulfat anhidrat (p.a, Merck).

Peralatan yang dipakai adalah filter 0,45 mikron, peralatan gelas, kertas saring, pipet mikro, dan timbangan analitik. Instrumen analisis terdiri dari instrumen HPLC Agilent 1200 Series (*Agilent Technologies*, USA) yang dilengkapi dengan detektor MWD (merk Agilent) dan kolom Zorbax ODS (C18), serta instrumen Spektrofotometer Shimadzu UV-vis mini 1240 Series (*Shimadzu Technologies*, Jepang).

Ekstraksi Beta Karoten (AOAC, 1999)

Ditimbang sebanyak 1-2 gram sampel minyak goreng, dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup, ditambahkan 10 mL KOH 10% metanol, divorteks, dihembuskan gas N₂ selama 30 detik. Lalu dipanaskan di dalam penangas air 65°C selama 60 menit, didinginkan (\pm 40°C). Dimasukkan ke dalam corong pemisah, diekstrak dengan petroleum eter sebanyak 3 x 15 mL, fraksi petroleum eter ditampung, dicuci dengan air suling, jika terdapat emulsi ditambahkan NaCl jenuh. Fraksi petroleum eter yang telah bersih disaring dengan Na₂SO₄ anhidrat, dikeringkan dengan gas N₂, dilarutkan kembali dengan fase gerak sebanyak 1 mL, disaring dengan membran 0,45 μ m, sampel siap dianalisis dengan HPLC dengan kondisi seperti pada Tabel 1. Untuk *spiked sample*, sampel minyak goreng sawit ditambahkan masing-masing 150, 300, 500, 750, dan 900 μ L larutan stok standar beta karoten 1000 μ g/mL.

Uji Spesifisitas

Uji spesifisitas dilakukan untuk mengetahui beta karoten dapat dianalisis atau tidak dengan metode analisis pada penelitian ini. Uji spesifisitas terlebih dahulu adalah melakukan *scanning* untuk mengetahui panjang gelombang yang menghasilkan serapan maksimum yang digunakan sebagai dasar analisis beta karoten dengan HPLC UV-vis, yaitu larutan standar beta karoten 100 μ g/mL *discanning* pada spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 400-500 nm. Kemudian dilakukan analisis standar beta karoten murni dan standar beta karoten yang *dispike* dalam sampel minyak goreng dengan menggunakan instrumen HPLC pada panjang gelombang maksimumnya.

Validasi Metode Analisis Beta Karoten

Validasi metode analisis beta karoten terdiri dari: uji spesifisitas, uji unjuk kerja instrumen (presisi, linieritas, limit deteksi dan limit kuantifikasi (LOD dan LOQ) instrumen), uji rekovery untuk menentukan akurasi dan repeatabilitas serta limit deteksi metode (MDL) dan uji *reproducibility* intra laboratorium. Data hasil validasi diolah dengan statistik. Metode analisis beta karoten dikatakan valid apabila memenuhi kriteria seperti pada Tabel 2. Validasi metode dilakukan mengikuti metode EURACHEM (1998).

Tabel 1. Kondisi operasi analisis beta karoten dengan HPLC-MWD (UV-Vis)

Kriteria	Kondisi
Kolom	Zorbax C18 (ODS), ukuran partikel pendukung 5 μ m, panjang 15 cm, diameter dalam 4,6 mm
Suhu <i>running</i>	Suhu ruang
Fase gerak	Asetonitril : isopropanol (65:35, v/v) (isokratik)
Laju aliran fase gerak	1,0 mL/menit
Deteksi	Visibel 452 nm
Sampel <i>loop</i>	20 μ L

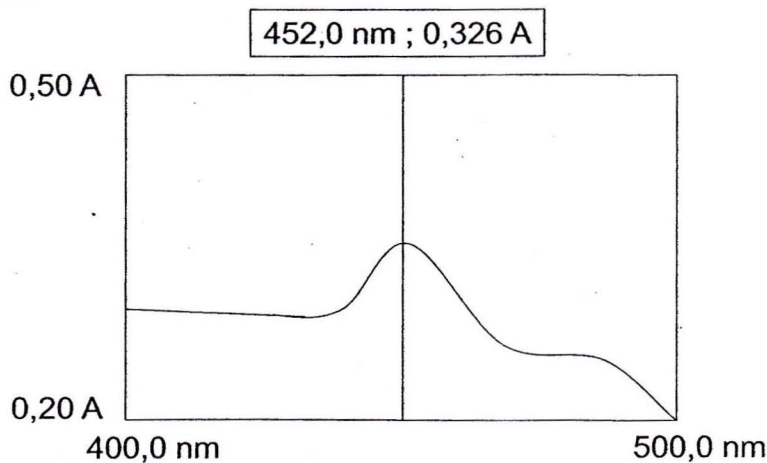
Tabel 2. Kriteria keberterimaan hasil validasi metode analisis

Parameter	Batas keberterimaan
Presisi instrumen (JECFA, 2006)	≤ 2,0%
Koefisien determinasi (R^2) pada uji linieritas	≥ 0,990
Persen rekoveri (akurasi) menurut AOAC (1993)	90 – 107%
Nilai relative standar deviasi atau RSD (presisi) menurut AOAC (1993)	≤ 5,30%

HASIL DAN PEMBAHASAN

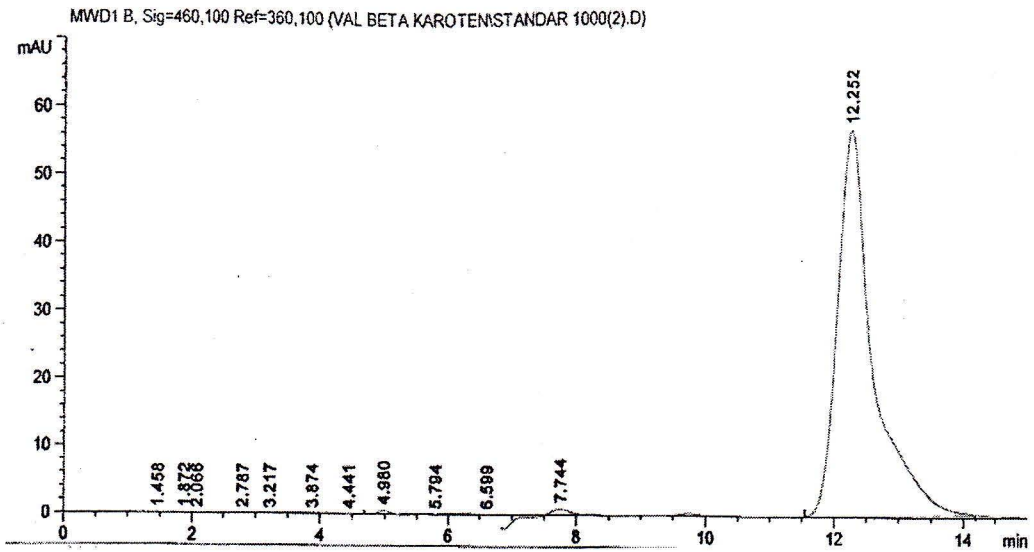
Uji Spesifisitas

Uji spesifisitas diawali dengan melakukan *scanning* terhadap standar beta karoten pada spektrofotometer pada panjang gelombang *visible* (400-500 nm) untuk mengetahui panjang gelombang yang menghasilkan serapan maksimum. Hasil *scanning* ditunjukkan pada Gambar 1. Dari hasil *scanning* diperoleh panjang gelombang maksimum beta karoten adalah 452 nm.

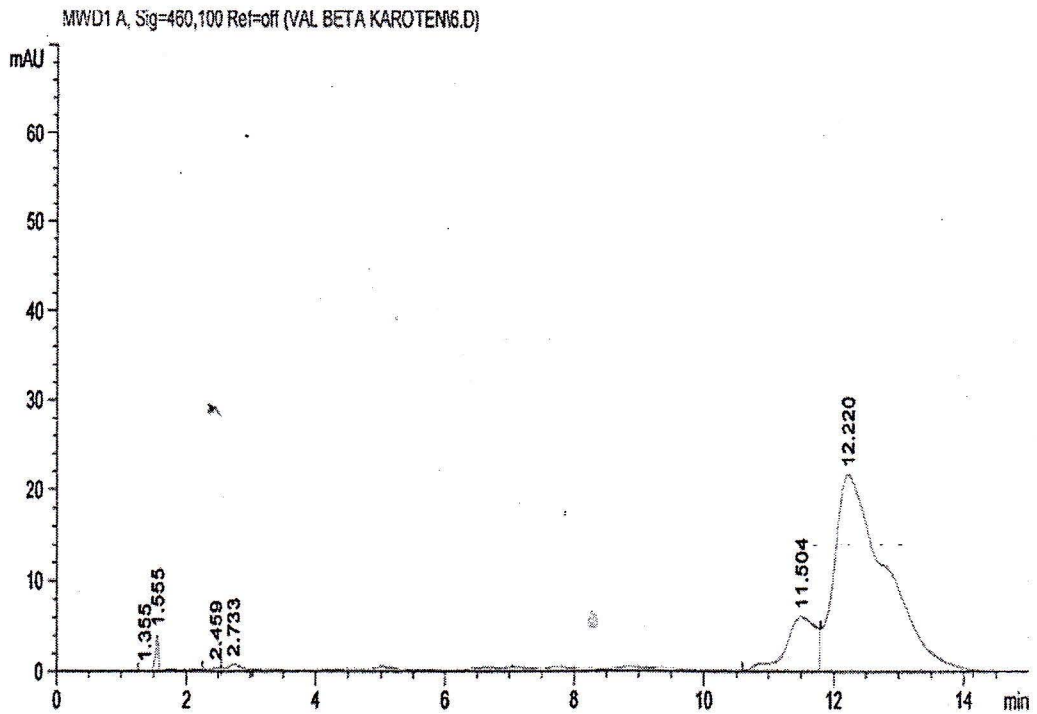


Gambar 1. Hasil *scanning* larutan standar beta karoten dengan Spektrofotometer UV-vis.

Spesifisitas analisis beta karoten menggunakan HPLC diuji dengan menggunakan larutan standar beta karoten (dilarutkan dalam fase gerak HPLC) dan dengan menggunakan sampel minyak goreng sawit yang tidak mengandung beta karoten. Pengujian larutan standar beta karoten yang dicoba memberikan peak tunggal pada waktu retensi 12,252 menit seperti Gambar 2. Spesifisitas standar beta karoten tersebut dengan menggunakan sampel minyak goreng yang *dispike* ditampilkan pada Gambar 3 dengan waktu retensi yang relative sama yaitu 12,220 menit. Beta karoten dalam sampel minyak yang *dispike* dapat terdeteksi sebagai peak tunggal, sehingga pengujian metode analisis beta karoten dalam sampel minyak dapat dilanjutkan dengan uji validasi.



Gambar 2. Kromatogram standar beta karoten hasil analisis dengan HPLC yang dilengkapi detektor MWD dengan deteksi pada λ 452 nm.



Gambar 3. Kromatogram sampel minyak goreng dengan *spiking* standar beta karoten hasil analisis dengan HPLC yang dilengkapi detektor MWD dengan deteksi pada λ 452 nm.

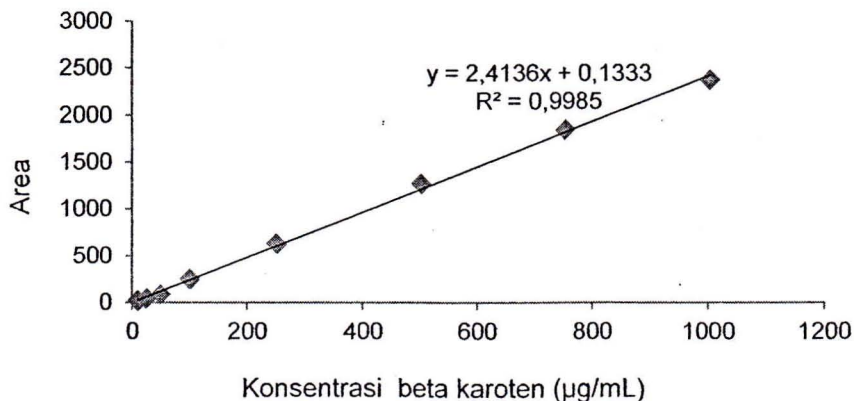
Uji Unjuk Kerja Instrumen

Hasil uji unjuk kerja instrumen yang pertama ditampilkan pada Tabel 3. Rata-rata waktu retensi beta karoten adalah 12,463 menit dengan presisi (RSD) sebesar 1,82%, sedangkan rata-rata luas area peak beta karoten adalah 17,01517 dengan presisi (RSD) sebesar 1,70%. Hasil RSD ini masuk ke dalam standar keberterimaan yaitu $\leq 2,0\%$ (JECFA, 2006).

Tabel 3. Hasil uji presisi instrumen HPLC pada analisis beta karoten menggunakan larutan standar beta karoten 10,0 $\mu\text{g/mL}$

Ulangan	Waktu retensi (menit)	Luas area peak
1	12,781	17,64541
2	12,763	17,10515
3	12,574	17,02285
4	12,379	16,96900
5	12,319	16,90188
6	12,236	16,68456
7	12,188	16,77734
Rata-rata	12,463	17,01517
SD	0,23	0,29
RSD (%)	1,82	1,70

Percobaan penentuan LOD dan LOQ instrumen dilakukan dengan menggunakan larutan standar beta karoten pada konsentrasi 10,0 $\mu\text{g/mL}$ (ppm). Hasil percobaan penentuan LOD dan LOQ dalam analisis beta karoten dengan HPLC terdapat pada Tabel 4, yang dihitung berdasarkan kurva kalibrasi standar beta karoten murni (Gambar 4). Hasil LOD dan LOQ instrumen beta karoten adalah 0,39 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,30 $\mu\text{g/mL}$. Linearitas instrumen telah memenuhi persyaratan, ini ditunjukkan dari nilai koefisien determinasi R^2 0.9985 dalam Gambar 4 yang memenuhi persyaratan menurut Tabel 2.



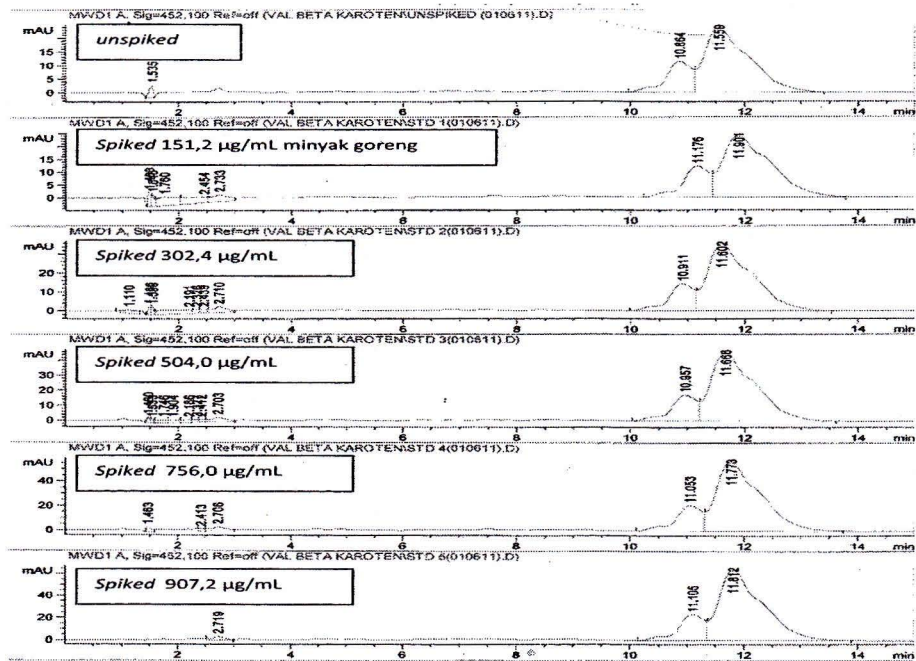
Gambar 4. Kurva kalibrasi standar yang dibuat dari injeksi langsung larutan beta karoten murni ke dalam instrumen HPLC.

Tabel 4. Data hasil percobaan penentuan LOD dan LOQ instrumen HPLC untuk analisis beta karoten

Ulangan	Luas area peak	Konsentrasi dari kurva standar (µg/mL)
1	17,64541	7,26
2	17,10515	7,03
3	17,02285	7,00
4	16,96900	6,98
5	16,90188	6,95
6	16,68456	6,86
7	16,77734	6,90
Rata-rata		6,99
SD		0,13
RSD (%)		1,85
LoD = 3 x SD		0,39
LoQ = 10 x SD		1,30

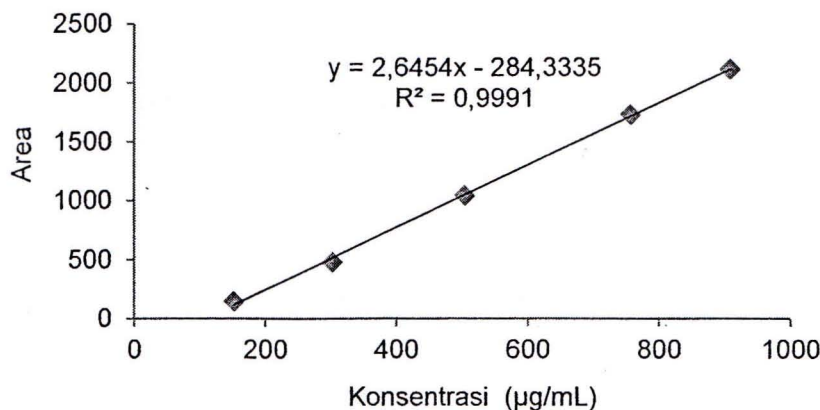
Linieritas Metode

Respon instrumen HPLC terhadap pengujian standar beta karoten yang *dispike* ke dalam sampel minyak goreng bersifat proporsional sesuai dengan besarnya konsentrasi standar. Respon tersebut terlihat pada Gambar 5. Semakin tinggi konsentrasi beta karoten akan semakin tinggi *peak*-nya.



Gambar 5. Respon HPLC pada berbagai konsentrasi *spiking* beta karoten dalam analisis beta karoten dalam minyak sawit.

Linieritas analisis beta karoten dapat diperoleh pada kisaran konsentrasi 150-900 µg/mL Gambar 6, yang mempunyai R^2 sebesar 0,9991, dan ini memenuhi standar linieritas yaitu diatas 0,990. Kurva ini digunakan sebagai kurva standar atau kurva kalibrasi pada uji MDL, *recovery*, *repeatability* (presisi), dan *reproducibility* senyawa beta karoten.



Gambar 6. Kurva kalibrasi analisis beta karoten dengan HPLC yang diperoleh dari uji adisi standar beta karoten dalam sampel minyak sawit.

Akurasi dan Presisi Metode dari Hasil Uji Rekoveri

Hasil uji rekoveri pada analisis beta karoten dilakukan pada 3 konsentrasi *spiking* yang berbeda yaitu 151,2 µg/g (rendah), 504 µg/g (sedang), dan 907,2 µg/g (tinggi) ditunjukkan pada Tabel 5. Hasil uji menunjukkan keakuratan hasil analisis diperoleh sebesar 90,25% (konsentrasi rendah), 90,05% (konsentrasi sedang), dan 90,97% (konsentrasi tinggi), hasil ini sesuai dengan AOAC (1993) yaitu 90 – 107%. Nilai presisi atau *repeatability* (RSD) pada 3 tingkat konsentrasi *spiking* berada pada kisaran 4,22 – 5,27%. Nilai presisi ini masuk pada batas keberterimaan menurut AOAC (1993) seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.

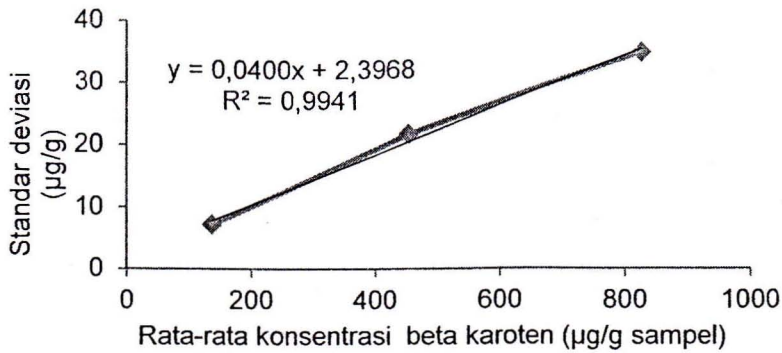
Tabel 5. Akurasi dan presisi analisis beta karoten dalam sampel minyak sawit dengan HPLC yang ditentukan dari uji rekoveri

Konsentrasi <i>spiking</i> (µg/g)	Rata-rata	SD	Rekoveri (%)	Presisi (%RSD)
151,2	136,5	7,2	90,25	5,27
504,0	453,8	21,8	90,05	4,80
907,2	825,3	34,8	90,97	4,22

Limit Deteksi Metode atau MDL (*Method Detection Limit*)

Hasil uji MDL ditentukan dari hasil uji rekoveri pada 3 konsentrasi *spiking* yang berbeda (hasil uji *recovery*), dengan membuat kurva hubungan antara rata-rata konsentrasi hasil uji rekoveri dengan standar deviasinya seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7. Dari hasil persamaan tersebut diperoleh nilai SD_0 ($x = 0$) yaitu 2,3968 µg/g sampel. MDL dihitung sebesar 3 kali SD_0 yang menghasilkan MDL sebesar 7,19 µg/g minyak goreng. Hasil MDL

merupakan batas deteksi beta karoten dalam minyak sawit yang dapat dianalisis dengan metode ini.



Gambar 7. Kurva hubungan antara standar deviasi (SD) dan konsentrasi dari hasil uji rekovery dalam analisis beta karoten dengan HPLC. Intersep kurva dengan sumbu y menunjukkan nilai SD_0 , dan limit deteksi metode (MDL) ditentukan dari $3 \times SD_0$.

Reproduktibilitas Intralab

Hasil uji reproduktibilitas intralab dilakukan setiap 1-2 minggu sekali selama 1,5 bulan dan hasilnya ditunjukkan pada Tabel 6. Reprodusibilitas tersebut ditunjukkan oleh nilai RSD yaitu 3,00%, dengan batas keberterimaan $\leq 5,30\%$ (AOAC, 1993), sehingga nilai reproduktibilitas intralab diterima.

KESIMPULAN

Hasil uji validasi metode analisis beta karoten dalam sampel minyak sawit dengan menggunakan instrumen HPLC fase terbalik dan detektor MWD (UV-Vis) yang diset pada panjang gelombang visible 452 nm dengan persiapan sampel menggunakan metode saponifikasi dan ekstraksi cair-cair menunjukkan hasil yang valid.

Tabel 6. Hasil uji reproduktibilitas intralab dalam uji validasi metode analisis beta karoten dengan HPLC

Minggu ke-	Hasil yang diperoleh (µg/g)	Rata-rata	SD	RSD (%)
1	1628,46	1563,70	91,58	5,86
	1498,94			
2	1622,07	1594,32	39,24	2,45
	1566,58			
3	1635,02	1588,48	65,81	4,14
	1541,94			
4	1626,70	1630,06	4,76	0,29
	1633,43			
5	1567,74	1562,38	7,57	0,48
	1557,03			
Rata-rata	1587,79	1587,79		
SD	47,67	27,64		
RSD (%)	3,00	1,74		

PUSTAKA

- AOAC. 1993. Peer Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures. Arlington, VA, USA.
- AOAC. 1999. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International, USA.
- Barba, A. I Olives, M. Camara Hurtado, M. C. Sanchez Mata, V. Fernandez Ruiz, M. Lopez Saenz de Tejada. 2006. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Journal Food Chemistry* 95 : 328-336.
- Burns, J., P. D. Fraser, P. M. Bramley. 2003. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols, and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry* 62 : 939-947.
- Chiu, M. C., Coutinho, C. M., GGoncalves, L. A. G. 2009. Carotenoids concentration of palm oil using membranes technology. *Desalination* 245 : 783-786.
- EURACHEM Working Group. 1998. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. EURACHEM Guide. 61 halaman.
- Garfield, F. G., E. Klesta, J. Hirsch. 2000. *Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories*. AOAC International, USA.
- Lin, C. H., Chen, B. H. 2003. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1012 : 103-109.
- Mortensen, A. 2005. Analysis of a complex mixture of carotenes from oil palm (*Elaeis guineensis*) fruit extract. *Food Research International* 38 : 847-853.
- Samaniego-Sánchez, C., Quesada-Granados, J. J., Serrana, H. L-G., López-Martinez, M. C. 2010. β -Carotene, squalene and waxes determined by chromatographic method in picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. *Journal of Food Composition and Analysis* 23 : 671-676.
- Silva, S. M., Silvana Aparecida Rocco, Klicia Araujo Sampaio, Thiago Taham, Luiza Helena Meller da Silva, Roberta Ceriani, Antonio J. A. Meirelles. 2011. Validation of a method for simultaneous quantification of total carotenes and tocopherols in vegetable oils by HPLC. *Food Chemistry* 129 : 1874-1881.