

PENGEMBANGAN METODE ANALISIS VITAMIN B1 PADA TEMPE MENGGUNAKAN MICROPLATE READER

Development of Vitamin B1 Analysis Method in Tempe using Microplate Reader

Nisrina Choerunisa¹, Indah Saraswati¹, Widyandani
Sasikirana^{1*} ¹Program Studi Farmasi, Universitas Diponegoro
*Corresponding author: widyandani.sasikirana@live.undip.ac.id

ABSTRAK

Vitamin B1 merupakan zat gizi yang banyak terdapat dalam biji-bijian. Salah satu makanan yang mengandung vitamin B1 dan banyak dikonsumsi masyarakat adalah tempe. Kadar vitamin B1 perlu diperhatikan karena vitamin ini tidak dapat disintesis oleh tubuh dan biasanya hilang ketika suatu makanan diolah. Metode analisis vitamin B1 perlu dikembangkan dan divalidasi untuk membuktikan bahwa metode analisis memenuhi persyaratan untuk digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh matriks dan validasi metode analisis vitamin B1 pada tempe menggunakan *microplate reader*. Validasi metode analisis vitamin B1 pada tempe dilakukan dengan metode standar adisi menggunakan *Microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm. Analisis data secara statistik menggunakan uji T. Hasil validasi menunjukkan bahwa metode analisis yang dikembangkan telah presisi ((RSD < 2), r 0,9976), sensitif (LOD 3,596 µg/mL, LOQ 11,987 µg/mL), dan akurat (nilai *recovery* 92-96%) dan adanya matriks tidak berpengaruh signifikan terhadap metode analisis yang digunakan (t hitung < t tabel (2,27 < 2,57)) sehingga metode analisis memenuhi kriteria persyaratan yang diperbolehkan.

Kata kunci : LOD, LOQ, tiamin, validasi metode

ABSTRACT

Vitamin B1 is nutrient that widely found in grains. One of the foods that contain vitamin B1 is tempeh. Vitamin B1 levels need to be considered because this vitamin cannot be synthesized by the body and is usually lost when a food is processed. The vitamin B1 analysis method needs to be developed and validated to prove that the analytical method meets the requirements for use. This study aims to determine the effect of matrix and validation of vitamin B1 analysis method in tempeh using Microplate Reader. The validation of vitamin B1 analysis method in tempe was carried out using the standard addition method using a Microplate Reader with a wavelength of 450 nm. Statistical analysis using the T-test. The validation results showed that the analytical method was precision ((RSD<2),r 0.9976), sensitive (LOD 3.596 µg/mL, LOQ 11.987 µg/mL), and accurate (recovery 92- 96%) and the presence of a matrix has no significant effect on the analytical method used (t count<t table (2.27<2.75)) so that the analytical method meets the criteria of the permissible requirement.

Keywords: *vitamin B1, tempe, validation method, microplate reader*

PENDAHULUAN

Tiamin ialah vitamin perangsang nafsu makan dan memiliki peran penting dalam sistem saraf (Asra *et al.*, 2018). Produk pangan tradisional di Indonesia yang mengandung vitamin B1 dan banyak dikonsumsi penduduk ialah tempe (BSN, 2015). Indonesia adalah penghasil tempe tertinggi di dunia yang telah menggunakan 50% atau 1,2 juta ton/tahun dari total konsumsi kedelai di Indonesia (Simanjuntak *et al.*, 2023). Santapan tempe mingguan per kapita pada tahun 2021 sebesar 0,146 kg (Badan Pusat Statistik, 2022). Tempe lebih digemari dibandingkan kedelai karena harganya terjangkau, rasanya enak, mengandung nutrisi yang tinggi dan lebih mudah dicerna oleh tubuh manusia (Aryanta, 2020).

Kadar vitamin B1 perlu diperhatikan karena vitamin ini tidak bisa disintesis oleh tubuh dan biasanya hilang ketika suatu makanan diolah (Fauziah *et al.*, 2016). Metode yang umum digunakan untuk menentukan kadar vitamin B1 adalah spektrofotometri (Association Of Official Analytical Chemist, 2022). Namun, spektrofotometri visual memerlukan waktu dan sampel yang banyak. Oleh karena itu, penting untuk mengembangkan metode analisis vitamin B1 yang sederhana, cepat, reliabel, sensitif dan spesifik.

Microplate reader memiliki prinsip kerja yang hampir sama dengan spektrofotometri. Bedanya, *microplate reader* dapat melakukan analisis dengan beberapa sampel sekaligus sehingga lebih cepat, memiliki teknik pengerjaan yang relatif sederhana, ekonomis dalam hal jumlah sampel yang digunakan dan cukup

sensitif sehingga dapat dikembangkan untuk analisis vitamin B1 (Santosa, 2020). Dalam pengembangan metode analisis, perlu dilakukan validasi untuk memperoleh hasil yang dapat dipercaya. Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui nilai parameter validasi dan pengaruh matriks tempe terhadap prosedur analisis vitamin B1 menggunakan *microplate reader*.

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu seperangkat alat *microplate reader*, timbangan analitis (Mettler Toledo), pH meter (Mettler Toledo), batang pengaduk, mikropipet, gelas ukur, gelas beaker, labu ukur, panci, kompor, blender, kertas saring, dan corong.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi “vitamin B1 (p.a Merck)”, aquadest, dapar amonia (pH 7,6), biru bromtimol 0,05% (Merck, Jerman), polivinil alkohol 1 % (Sigma, USA), kacang kedelai, ragi tempe, dan daun pisang.

Pembuatan Larutan Induk Vitamin B1

Sebanyak 25 mg vitamin B1 ditimbang, kemudian dimasukkan ke labu ukur 50 mL, selanjutnya ditambahkan aquadest sampai garis batas dan didapatkan larutan induk vitamin B1 dengan konsentrasi 500 µg/mL (Fauziah *et al.*, 2016).

Linieritas dan Sensitivitas (LOD dan LOQ)

Larutan vitamin B1 200 µg/mL dibuat dengan mengambil 4 mL larutan stok vitamin B1 menggunakan pipet, dimasukkan ke labu

ukur 10 mL, ditambahkan dapar amonia (pH 7,6) sebanyak 1,5 mL, 0,05 % biru bromtimol sebanyak 3 mL dan 1 % polivinil alkohol sebagai agen *solubilization* sebanyak 1 mL, selanjutnya dicukupkan menggunakan aquadest sampai garis batas, dicampur dan didiamkan selama 2 menit. Seri larutan vitamin B1 dengan konsentrasi 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 µg/mL dibuat dari larutan vitamin B1 200 µg/mL. Absorbansi diukur menggunakan *microplate reader* dengan blanko aquadest pada panjang gelombang 450 nm, dibuat kurva baku vitamin B1 dengan memplotkan nilai konsentrasi vitamin B1 vs absorbansi. Selanjutnya dihitung nilai LOQ dan LODnya sesuai rumus sebagai berikut:

$$\text{LOD} = 3 \times \frac{Sa}{b}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{Sa}{b}$$

Keterangan:

Sa : Standar deviasi dari blanko

b : Slope

Presisi

Larutan vitamin B1 dibuat 3 seri konsentrasi yang berbeda yaitu 45, 55 dan 65 µg/mL, ditambahkan 1,5 mL dapar amonia (pH 7,6), 0,05% biru bromtimol 3 mL dan 1% polivinil alkohol sebagai agen *solubilization* 1 mL, lalu dicukupkan menggunakan aquadest sampai garis batas labu ukur 5 ml, dicampur dan ditunggu selama 2 menit. Absorbansi diukur menggunakan *microplate reader* dengan blanko aquadest pada panjang gelombang 450 nm. Larutan vitamin B1 masing-masing konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 6x dan dikerjakan berurutan selama 3 hari, kemudian nilai RSD dihitung dengan rumus sebagai berikut

$$\text{RSD} = \frac{\text{simpangan baku}}{\text{rata-rata}} \times 100\%$$

Pembuatan Tempe

Kedelai dicuci, direndam dengan air mendidih sampai selama 12 jam untuk membantu tumbuhnya asam laktat yang dapat menurunkan pH untuk menghambat bakteri kontaminan. Kedelai dicuci kembali menggunakan air dan di remas-remas sampai biji kedelai terbelah dan kulit arinya terkelupas. Kulit ari dibuang dan kedelai bersih dikukus selama 40 menit sampai matang, kemudian disebar pada tampah yang kering dan bersih. Kedelai didinginkan pada suhu ruang, ditambahkan ragi tempe (*Rhizopus oligosporus*) secukupnya yaitu 10 g ragi untuk 1 kg kedelai. Tempe dikemas menggunakan daun pisang dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam (Alvina, 2019).

Pengolahan Sampel

Tempe dihaluskan menggunakan blender, lalu ditimbang 10 gram menggunakan timbangan analitik, sampel diletakkan ke dalam gelas beaker, selanjutnya diberi aquadest 100 mL, dikocok homogen, ditunggu ± 1 jam, kemudian disaring dan dicukupkan dengan aquadest dalam labu ukur 100 mL (Fauziah *et al.*, 2016).

Akurasi

Sebanyak 200 µL filtrat sampel tempe diambil menggunakan mikropipet, dimasukkan masing-masing ke dalam 4 tube 1,5 mL yang berbeda, ditambahkan larutan vitamin B1 3 konsentrasi berbeda (45, 55 dan 65 µg/mL), ditambahkan 220 µL dari campuran reagen 1,5 mL dapar amonia (pH

7,6), biru bromtimol 0,05% sebanyak 3 mL dan polivinil alkohol 1% sebanyak 1 mL, lalu aquadest dicukupkan sampai 1 mL, diaduk homogen, didiamkan sekitar 2 menit. Absorbansi diukur menggunakan *microplate reader* dengan blanko aquadest pada panjang gelombang 450 nm. Selanjutnya kadar vitamin B1 yang terukur ditentukan melalui persamaan regresi dari kurva baku. Kadar yang diperoleh digunakan untuk menentukan nilai perolehan kembali menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Recovery} = \frac{\text{kadar terukur} - \text{kadar diketahui}}{\text{kadar diketahui}} \times 100\%$$

Pembuatan kurva adisi

Sebanyak 200 μL filtrat sampel tempe diambil menggunakan mikropipet, dimasukkan masing-masing ke dalam *tube* 1,5 mL, ditambahkan larutan vitamin B1 dengan konsentrasi 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 $\mu\text{g/mL}$, ditambahkan 220 μL dari campuran reagen 1,5 mL dapar amonia (pH 7,6), 0,05 % biru bromtimol 3 mL dan 1 % polivinil alkohol 1 mL, lalu aquadest dicukupkan sampai 1 mL, dikocok homogen. Absorbansi diukur menggunakan *microplate reader* dengan blanko aquadest pada panjang gelombang 450 nm. Kurva adisi dibuat berdasarkan plot konsentrasi vs absorbansi yang didapatkan.

Penentuan pengaruh matriks pada prosedur analisis

Pengaruh matriks pada prosedur analisis ditetapkan melalui perbandingan antara *slope*/kemiringan kurva baku dan kurva adisi yang ditentukan oleh signifikansi perbedaan kemiringan/*slope*. Uji signifikansi

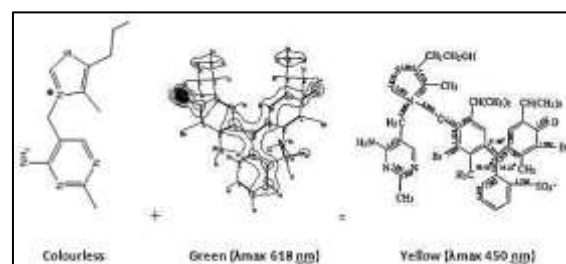
dinilai dari perbandingan standar deviasi *slope* kurva baku dengan kurva adisi.

Analisis Data

Pengolahan data dikerjakan secara statistik dengan menggunakan uji T untuk menentukan signifikansi antara kurva baku dan kurva adisi (Ermer *et al.*, 2005) dengan derajat kepercayaan 95% atau taraf signifikansi 5% ($\alpha=0,05$) (Ghozali, 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis vitamin B1 dilakukan dengan penambahan reagen biru bromtimol 0,05% untuk mendapatkan kompleks asosiasi ion (Liu *et al.*, 2012). Penambahan polivinil alkohol 1% diperlukan untuk meningkatkan kelarutan biru bromtimol di dalam air sehingga bisa berikatan dengan vitamin B1 (Rahmawati *et al.*, 2020).



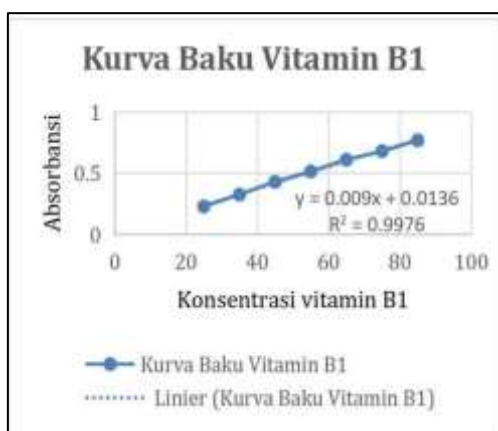
Gambar 1. Reaksi vitamin B1 dan biru bromtimol (Liu *et al.*, 2012)

Reaksi ini dilakukan pada pH 7,6 (Chandra *et al.*, 2019). Perubahan warna terjadi saat biru bromtimol bereaksi dengan vitamin B1, dimana warna larutan yang semula hijau akan berubah warna menjadi warna kuning pada pH 7,6 dan absorbansi meningkat pada panjang gelombang 450 nm (Liu *et al.*, 2012).

Validasi metode analisis

Linieritas

Hasil linieritas kurva baku ditunjukkan oleh gambar 2. Nilai koefisien korelasi yang diperoleh sebesar 0,9976 menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang linear antara konsentrasi dan absorbansi vitamin B1 yang sesuai dengan hukum Lambert-Beer (Riyanto, 2014).



Gambar 2. Kurva Baku Vitamin B1

Sensitivitas (LOD dan LOQ)

Sensitivitas instrumen *microplate reader* dalam menganalisis analit (vitamin B1) dapat diketahui melalui nilai LOD dan LOQ. Hasil LOD dan LOQ yang diperoleh berturut-turut yaitu 3,596 $\mu\text{g/mL}$ dan 11,987 $\mu\text{g/mL}$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa alat mempunyai sensitivitas yang baik dalam menganalisis vitamin B1. Selain itu, konsentrasi vitamin B1 pada sampel tempe dapat dianggap sebagai respon alat ketika kadarnya berada di atas 3,596 $\mu\text{g/mL}$, jika konsentrasi analit kurang dari 3,596 $\mu\text{g/mL}$ maka sinyal yang terdeteksi oleh alat merupakan *noise* dan absorbansi yang

Tabel 1. Presisi *intraday* dan *interday*

Hari ke-	1	2	3
----------	---	---	---

diterima tidak bisa dipercaya (Ratnawati *et al.*, 2019). Namun, sensitivitas alat masih kurang baik dibandingkan dengan spektrofotometer *visible* seperti yang ditunjukkan oleh Fauziah (2016) pada penelitiannya dengan nilai LOD 0,8684 $\mu\text{g/mL}$ dan LOQ 2,8947 $\mu\text{g/mL}$ dan pada penelitian Chandra (2019) secara spektrofotometri UV-Vis didapatkan nilai LOD 0,0883 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai LOQ 0,2944 $\mu\text{g/mL}$.

Presisi

Hasil presisi ditunjukkan pada tabel 1 bahwa nilai RSD untuk sampel vitamin B1 dalam waktu kurang dari satu hari (*intraday*) maupun pada hari yang berbeda (*interday*) pada masing-masing 3 konsentrasi yang berbeda adalah $\leq 2\%$ (rentang 1,5 - 1,9). Hal tersebut menunjukkan bahwa metode telah presisi dan dapat dipercaya (RSD $\leq 2\%$) (Chan, 2004).

Akurasi

Akurasi digunakan untuk mengevaluasi seberapa baik sistem dapat memprediksi data dengan benar. Hasil *%recovery* yang diperoleh berada pada rentang 92-96% menunjukkan bahwa metode yang dikembangkan sesuai dengan persyaratan (85- 115%) (Chan, 2004). Hasil ini memberikan indikasi bahwa metode dapat secara konsisten mengembalikan nilai sebenarnya dari sampel yang dianalisis, mencerminkan tingkat ketepatan prosedur analisis.

Vit B1 (ppm)	45	55	65	45	55	65	45	55	65
	0,409	0,477	0,581	0,410	0,498	0,571	0,395	0,488	0,576
	0,410	0,494	0,594	0,409	0,492	0,582	0,409	0,494	0,591
Abs	0,413	0,484	0,595	0,420	0,515	0,590	0,418	0,470	0,575
	0,397	0,498	0,590	0,421	0,508	0,589	0,406	0,488	0,582
	0,420	0,499	0,607	0,405	0,498	0,593	0,407	0,488	0,591
	0,405	0,488	0,606	0,416	0,512	0,600	0,408	0,496	0,599
	\bar{x}	0,409	0,490	0,595	0,413	0,504	0,587	0,407	0,487
SD	0,008	0,009	0,010	0,006	0,009	0,010	0,008	0,009	0,009
RSD	1,902	1,735	1,629	1,568	1,778	1,691	1,844	1,886	1,568

Intraday : hari ke-1

Interday : hari ke-2 dan ke-3

Tabel 2. Akurasi metode analisis vitamin B1 dengan *microplate reader*

Kadar Diketahui ($\mu\text{g/mL}$)	Abs	Kadar Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata ($\mu\text{g/mL}$)	%Recovery
Sampel	0,323	34,378	34,674 \pm 0,421	
	0,33	35,156		
	0,324	34,489		
45	0,715	77,933	76,378 \pm 1,365	92,675
	0,696	75,822		
	0,692	75,378		
	0,791	86,378		
55	0,803	87,711	87,230 \pm 0,740	95,556
	0,802	87,600		
	0,863	94,378		
65	0,86	94,044	94,563 \pm 0,632	92,137
	0,871	95,267		

Pengaruh Matriks Terhadap Prosedur Analisis

Metode dikatakan dapat mengeliminasi pengaruh matriks dengan baik apabila perbedaan slope antara kurva baku dan kurva adisi tidak berbeda secara signifikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara kurva baku standar dengan kurva baku adisi (Gambar 3). Dua variabel dikatakan berbeda signifikan jika nilai t -tabel < t -hitung (Nuryadi, 2017). Hasil yang diperoleh nilai t -tabel (2,57) > t -hitung (2,27), sehingga bisa disimpulkan bahwa perbedaan *slope* kurva baku dan kurva adisi tidak berbeda secara signifikan dan adanya matriks tempe tidak mempengaruhi prosedur analisis vitamin B1 menggunakan *microplate reader*. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa nilai t -hitung yang lebih rendah dari nilai t -tabel menegaskan bahwa penggunaan matriks tempe tidak mempengaruhi prosedur analisis, menguatkan kesimpulan bahwa metode ini dapat diandalkan untuk studi kualitatif dan kuantitatif vitamin B1.



Gambar 3. Hubungan kurva baku standar vitamin B1 dengan kurva adisi

SIMPULAN

Microplate reader merupakan metode penentuan kadar vitamin B1 pada tempe yang valid dan dapat dipercaya terbukti dengan hasil uji validasi metode

yang meliputi linieritas, LOD, LOQ, presisi dan akurasi telah memenuhi persyaratan yang berlaku. Pengaruh matriks tempe terbukti tidak mempengaruhi prosedur analisis yang dikembangkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvina, A. dan Dany, H. (2019) 'Proses Pembuatan Tempe Tradisional', *Jurnal Pangan Halal*, 1(1), 9-12. <https://doi.org/10.30997/jiph.v1i1.2004>
- Aryanta, I. (2020) 'Manfaat Tempe Untuk Kesehatan', *E-Jurnal Widya Kesehatan*, 2(1), 44-50. <https://doi.org/10.32795/widyakesehatan.v2i1.609>
- Asra, R., Chandra, B., Zulharmita. dan Febrianti, E. (2018) 'Analisis Kualitatif Vitamin B1 Pada Kacang Hijau (*Phaseolus radiates* L.) Menggunakan Metode Konvensional dan KLTKT Silika Gel 60 F254', *Jurnal Farmasi Higea*, 10(2), 147-153. <http://dx.doi.org/10.52689/higea.v10i2.190>
- Association Of Official Analytical Chemist [AOAC]. (2022) '*Official Methods of Analysis*', Updated 2005
- Badan Pusat Statistik [BPS]. (2020) *Rata-Rata Konsumsi Per Kapita Seminggu Beberapa Macam Bahan Makanan Penting 2007-2021*, Updated 2021
- Badan Standarisasi Nasional [BSN]. (2015) *Standar Nasional Indonesia Tempe Kedelai*. Jakarta: BSN.
- Chan, C.C., Lee, Y.C., Lam, H. and Zhang, X.M. (2004) '*Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*'. United

- Stated of America: A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Chandra, B., Zulharmita dan Putri, W.D. (2019) 'Penetapan Kadar Vitamin C Dan B1 Pada Buah Naga Merah (*Hylocereus Lemairei* (Hook.) Britton & Rose) Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis', *Jurnal Farmasi Higea*, 11(1), 62-74. <http://dx.doi.org/10.52689/higea.v1i1.1.215>
- Ermer, J., Hon, H. and Miller. (2005) *Method Validation In Pharmaceutical Analysis*. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Fauziah, F., Roslinda, R. dan Angga, P. A. (2016) 'Penetapan Kadar Vitamin B1 Pada Kacang Kedelai dan Tempe yang Beredar di Pasar Raya Padang Secara Spektrofotometri Visibel', *Jurnal Farmasi Higea*, 8(1), 1-7. <http://dx.doi.org/10.52689/higea.v8i1.132>
- Ghozali, I. (2016) *Aplikasi Analisis Multivariete Dengan Program IBM SPSS 23. Edisi 8*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Harmita. (2006) *Analisis Kuantitatif Bahan Baku Dan Sediaan Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Kuswandi, B. (2010) *Sensor Kimia*. Jember: Universitas Jember Press.
- Liu, S., Zhang, Z., Liu, Q., Luo, H. and Zheng, W. (2012) 'Spectrophotometric Determination Of Vitamin B1 In a Pharmaceutical Formulation Using Triphenylmethane Acid Dyes', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(3), 685-694. DOI: 10.1016/s0731-7085(02)00356-4.
- Nuryadi, Astuti, T.D., Utami, E.S. dan Buadiantara, M. (2017) *Dasar-Dasar Statistik Penelitian*. Yogyakarta: Sibuku Media.
- Rahmawati, P.Z. dan Sa'diyah, D.C. (2020) 'Penetapan Kadar Vitamin B1 Pada Genjer (*Limnocharis flava*) Dengan Pengukuran Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis', *The Journal of Muhammadiyah Medical Laboratory Technologist*, 3(2), pp. 1-10. <https://doi.org/10.30651/jmlt.v3i2.4782>
- Ratnawati, N.A., Prasetya, A.T. dan Rahayu, E.F. (2019) 'Validasi Metode Pengujian Logam Berat Timbal (Pb) Dengan Destruksi Basah Menggunakan FAAS Dalam Sedimen Sungai Banjir Kanal Barat Semarang', *Indonesian Journal of Chemical Science*, 8(1), pp. 60-68. <https://doi.org/10.15294/ijcs.v8i1.28030>
- Riyanto. (2014) Validasi dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai Dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian Dan Kalibrasi. Edisi 1. Yogyakarta: Deepublish.
- Santosa, B. (2020) Teknik elisa : Metode Elisa Untuk Pengukuran Protein Metallothionein Pada Daun Padi Ir Bagendit. Semarang: Unimus Pres
- Simanjuntak, B.Y., Wahyudi, A., Elly, N., Okfrianti, Y. (2023) 'Produk Olahan Inovatif Tempe Sebagai Alternatif Meningkatkan Konsumsi dan Peluang Usaha', *Gemassika : Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 7(3), 76-83. <https://doi.org/10.30787/gemassika.v7i1.670>