

SISTEM ANALISIS SUNTIK ALIR BIAMPEROMETRI UNTUK PENETAPAN KADAR VITAMIN C*

A BIPOTENTIOMETRIC FIA SYSTEM FOR DETERMINATION OF VITAMIN C

Harjana*, Imam Siswanto**, Muzakki**, Sumardi**, Miftahul Huda***

* Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

** Fakultas MIPA, Universitas Airlangga, Surabaya

*** Poilteknik, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya

ABSTRACT

A bipotentiometric FIA system has been developed for the determination of vitamin C. The system was a single stream manifold, which consisted of a peristaltic pump, a self made injector with internal loop and two Pt-electrodes connected to a PC by serial ADC or parallel ADC interface card. One of the Pt-electrodes was located in the injector before the internal loop, while the other electrodes at the end of the TEFLON reaction tube. The PC was supported with a self-made software for controlling the pump, signal acquisition, processing, and visualisation, and further peak determination, followed by calibration of standard solutions and calculation of sample concentrations. The above FIA-system configuration was applied to determine vitamin C by the injection of sample solution into a stream of potassium hexacyanoferrate (III) solution. The optimum result was achieved with knitted tube reaction of 0.8 mm i.d., 50 cm length, at flow rate 0,64 ml/minute, and consumed 3.6 ml of carrier solution per five injection, and gave linearity range at 0.001 – 0.100 N vitamin C, with the coefficient of correlation 0.9999, RSD peak to peak better than 3.0% and the error of artificial samples were less than 3.4 %.

Key Words : Bipotentiometric-FIA, injector with internal loop, module-program, vitamin C

ABSTRAK

Telah dikembangkan suatu sistem analisis suntik alir bipotensiometri untuk penetapan kadar vitamin C. Sistem mempunyai *manifold* jalur tunggal dan terdiri dari pompa peristaltik, injektor dengan *loop internal* buatan sendiri dan dua elektrode Pt yang dihubungkan ke PC melalui ADC gawai antar muka secara serial atau paralel. Salah satu elektrode Pt ditempatkan di dalam injektor, sebelum *loop internal*, dan elektrode Pt yang lain ditempatkan pada ujung akhir jalur reaktor, yang terbuat dari TEFLON. PC dilengkapi dengan perangkat lunak buatan sendiri, untuk mengendalikan pompa, untuk akuisasi, mengolah dan menggambarkan sinyal, dan selanjutnya untuk kalibrasi larutan baku dan menghitung kadar sampel. Konfigurasi sistem analisis suntik alir ini diterapkan untuk penetapan kadar vitamin C, dengan menyuntikkan larutan sampel ke dalam aliran pereaksi heksasianoferat(III). Hasil optimum didapat dengan jalur reaksi, yang dirajut; berdiameter dalam 0,8 mm sepanjang 50 cm, pada laju alir 0,64 ml/menit dan pada laju alir ini tiap lima suntikan memerlukan 3,6 ml larutan pereaksi. Kurva kalibrasi mempunyai koefisien korelasi sebesar 0,9999, RSD antar puncak sinyal lebih kecil dari 3,0% dan galat analisis sampel tiruan kurang dari 3,4%

Kata kunci : ASA bipotensiometri, injektor dengan *loop internal*, modul-program, vitamin C

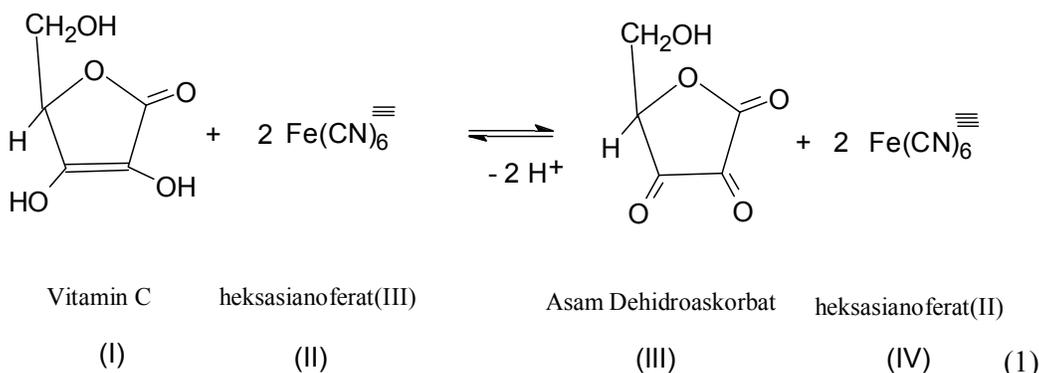
PENDAHULUAN

Vitamin C berada dalam kadar yang berbeda dalam berbagai sampel alam, makanan dan sediaan

* Sebagian dari hasil penelitian RUT-V tahun ke 2 (1998/1999)

farmasi. Teknik ASA (Analisis Suntik Alir atau FIA, *flow injection analysis*) termasuk salah satu teknik analisis yang dirancang untukantisipasi kebutuhan analisis cepat akibat meningkatnya beban dan frekuensi analisis. Deteksi secara fotometri dan elektrometri banyak ditulis dalam publikasi penetapan kadar vitamin C secara ASA. Hasebe dan Kawashima, 1996 menetapkan vitamin C secara ASA kemiluminesen dan Huang *et al.*, 1997 menetapkan vitamin C dengan *stopped-flow* ASA spektrofotometri. Sedangkan Yu *et al.*, 1987, menetapkannya dengan cara ASA voltametri dengan modifikasi elektrode pasta karbon dan Sano *et al.*, 1995 dengan mediasi Cu(II) deteksi elektrokimia serta Veltsistas *et al.*, 2000, dengan membran ISE

Dalam artikel telaah penetapan kadar vitamin C secara fotometri, Arya *et al.*, 1998, menuliskan bahwa salah satu penetapan secara spektrofotometri adalah dengan mengukur penurunan intensitas warna pereaksi heksasianoferat(III) setelah direaksikan dengan vitamin C.



Reaksi di atas dipakai sebagai dasar untuk merancang sistem ASA bagi penetapan kadar vitamin C dalam penelitian ini, dengan cara mengukur perubahan potensial redoks pada saat penyuntikan larutan vitamin C ke dalam aliran larutan heksasianoferat(III). Sistem ASA dalam penelitian ini adalah ASA jalur tunggal, dengan menggunakan injektor, sel detektor dan perangkat lunak buatan sendiri.

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan hasil akuisisi sinyal antara kombinasi gawai antar muka serial ADC-Pentium PC dengan kombinasi gawai antar muka paralel ADC-IBM-PC/XT, dari segi kemandapan sinyal dan mencari kondisi optimum parameter laju alir dan panjang jalur reaksi untuk penetapan kadar vitamin C serta untuk mengetahui rentang linieritas, presisi dan akurasi hasil terapan sistem ASA yang dibuat.

METODOLOGI

Bahan

Asam Askorbat, p.a. (E Merck), Kalium heksasianoferat(III), p.a. (E Merck), Aqua demineralisata

Alat

Sistem ASA jalur tunggal yang terdiri dari : (a) Vario-pump; sel detektor-1 yang dipadukan pada injektor yang mempunyai *internal-loop* dengan volume suntik tetap sebesar 25 μ L dan dibuat dari lempeng poliakrilik setebal 10 mm; rajutan pipa TEFLON Φ dalam 0,8 mm, sebagai jalur reaktor dan sel detektor-2. Pompa peristaltik dihubungkan dengan PC melewati melewati ADAM-4021 dan ADAM-4520. Kedua elektroda dihubungkan ke PC dengan melewati ADAM-4011 dan ADAM-4520 untuk Pentium PC dan melewati paralel ADC-card untuk IBM-PC/XT. Detektor adalah elektrode kawat Pt Φ 0,5 mm. (b) *software* pengendalian pompa, akuisisi, visualisasi dan pengolahan data yang *source programnya* dibuat dalam bahasa BASIC

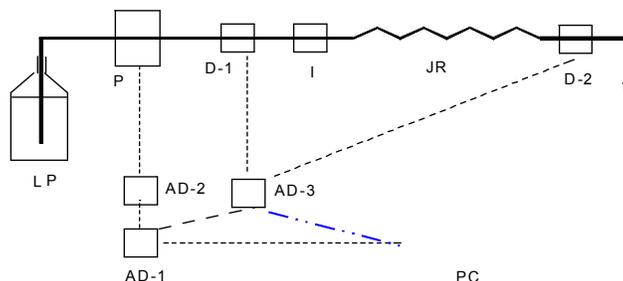
Jalannya Penelitian

Sistem ASA ini dioptimalkan dengan peragam laju alir dan panjang jalur reaksi, untuk tujuan penetapan kadar vitamin C, yang disuntikkan ke dalam jalur larutan heksasianoferat(III). Kadar larutan baku asam askorbat diragam dari 0,001 - 0,1 N dan kadar larutan pereaksi heksasianoferat(III) 0,05 N. Masing-masing penyuntikan larutan baku atau sampel diulang tiga atau lima kali. Ragam laju alir adalah 0,185 ml/menit dan 0,640 ml/menit dan ragam panjang jalur reaksi adalah 5 cm, 10 cm, 20 cm dan 50 cm. Selanjutnya dinilai kemandapan garis dasar dengan mengukur SD garis dasar; tingkat kepekaan; rentang

linieritas; koefisien korelasi garis regresi antara log kadar vitamin C dengan tinggi puncak; presisi/RSD tinggi puncak dan akurasi dari perolehan kembali kadar sampel vitamin C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Di antara metode instrumental, metode potensiometri termasuk metode yang sederhana. Metode ini hanya memerlukan elektrode dan potensiometer yang harganya relatif murah bila dibanding dengan instrumen lain. Dengan memanfaatkan *ADC-card* maka PC telah dapat dimanfaatkan sebagai pengganti potensiometer, sekaligus sebagai pengolah data (Harjana dkk., 1997). Gambar 1 menunjukkan konfigurasi alat ASA pada penelitian ini..



Gambar 1 Bagan balok sistem ASA bipotensiometri LP = botol tandon larutan pereaksi; P = pompa peristaltik; D-1 = detektor-1, berisi elektrode Pt; I = injektor; JR = jalur reaktor; D-2 detektor-2, berisi elektrode Pt; AD-1 = Adam-4520; AD-2 = ADAM-4021; AD-3 = ADAM-4011 atau paralel ADC (— ..—) dan PC = komputer

Larutan pereaksi heksasianoferat(III) dipompa ke jalur *manifold* mengenai lektrode Pt dalam sel detektor-1, lalu ke injektor, terus ke jalur reaktor dan terakhir mengenai elektrode Pt dalam sel detektor-2, sebelum dibuang ke botol penampung. Pada saat larutan vitamin C disuntikkan ke dalam jalur pereaksi, maka dalam perjalanan menuju detektor-2, terjadi reaksi redoks dengan heksasianoferat(III), sehingga kadar heksasianoferat(III) saat sampai di detektor-2 mengalami penurunan, akibatnya terjadi perbedaan potensial antara kedua elektrode Pt. Perbedaan inilah yang dibaca sebagai sinyal oleh PC. Gambar 2 menunjukkan contoh visualisasi puncak-puncak hasil sistem ASA yang dibuat.

Gambar 2. Puncak-puncak replikasi suntikan 25 μ L larutan baku dan sampel vitamin C pada sistem ASA bipotensiometri pada laju alir 0,640 ml/mnt, panjang jalur reaktor 50 cm. Larutan vitamin C : B1 = 0,100 N; B2 = 0,050 N; B3 = 0,020 N; B4 = 0,010 N; B5 = 0,005 N; B6 = 0,002 N dan B7 = 0,001 N. S1, S2 dan S3 larutan sampel 1,2 dan 3

Pada penelitian ini dibuat modul-modul program pengendalian pompa peristaltik, data akuisasi sinyal; penentuan tinggi, luas dan lebar puncak; penyimpanan data; dan modul pengolahan data untuk mencari hubungan antara log kadar analit dan tinggi/lebar puncak. Seluruh program ini dipadukan menjadi satu menjadi suatu program *real-time* dengan nama INTFIA. Perolehan data disimpan dalam suatu file, agar dapat dibaca dan dievaluasi ulang dengan program yang sama atau diolah dengan MS-EXCEL.

Pengaruh laju alir dan panjang jalur reaktor

Kesempurnaan reaksi pada ASA tergantung kepada kecepatan reaksi kimia dan lamanya dispersi analit dalam larutan pereaksi. Di satu sisi dispersi analit akan memperlama waktu kontak dengan reaktan, yang berarti menunjang kesempurnaan reaksi, di sisi lain jika reaksi telah sempurna, sedangkan dispersi masih tetap berlanjut maka akan terjadi pengenceran hasil reaksi. Faktor yang mempengaruhi dispersi analit ini adalah laju alir, panjang jalur, volume suntik dan diameter jalur reaktor. Dalam penelitian ini volume suntik dan diameter jalur reaktor dibuat tetap, yaitu volume suntik = 25 μ L dan diameter dalam jalur 0,8 mm, sedangkan laju alir dua macam, yaitu 0,185 ml/mnt dan 0,640 ml/mnt, serta panjang jalur reaktor adalah 5, 10, 20 dan 50 cm.

| Data pers. Garis regresi | Laju alir 0,640 ml/mnt | | | | Laju alir 0,185 ml/mnt | | | |
|--------------------------|------------------------|--------|--------|--------|------------------------|--------|--------|--------|
| | 5 cm | 10 cm | 20 cm | 50 cm | 5 cm | 10 cm | 20 cm | 50 cm |
| Koef kor | 0,9945 | 0,9921 | 0,9949 | 0,9999 | 0,9933 | 0,9875 | 0,9817 | 0,9821 |
| <i>Slope</i> | 47,00 | 42,61 | 38,25 | 27,88 | 39,43 | 32,68 | 32,70 | 28,46 |
| <i>Intercept</i> | 148,04 | 141,27 | 128,65 | 99,23 | 107,24 | 90,39 | 88,16 | 75,47 |

Gambar 3 Kurva log kadar vitamin C vs tinggi puncak dan data persamaan garis regresinya pada laju alir 0,640 ml/mnt dan 0,185 ml/mnt, dengan panjang jalur reaktor 50, 20, 10 dan 5 cm

Pembacaan beda potensial bipotensiometri dalam penelitian ini dilakukan dengan mengukur beda tegangan antara detektor D-1 dan D-2. Tegangan D-1 tergantung pada kadar larutan heksasianoferrat(III) yang melewatinya dan untuk satu seri penetapan nilainya tetap. Tegangan D-2 tergantung pada kesempurnaan reaksi dan ekuivalensi antara reaktan (I) dan (II). Jika pada setiap puncak reaksinya sempurna dan ekuivalen, maka pada detektor D-2 nilai $E_{(III)/(I)}$ akan sama dengan nilai $E_{(II)/(IV)}$, sehingga tinggi puncak, yaitu selisih antara tegangan D-1 dan D-2, dapat memberi gambaran hubungan linier dengan log kadar (I) atau log kadar (II). Pada Gambar 3, kesempurnaan dan ekuivalensi ini ditunjukkan pada kombinasi laju alir 0,640 ml/mnt dan panjang jalur reaktor 50 cm, yang mempunyai *slope* mendekati teori ($n = 2$) yaitu *slope* sebesar 0,028 V. Jika waktu dispersi terlalu singkat, maka reaksi belum sempurna, sehingga masih ada sisa reaktan (I), padahal potensial redoks (I) lebih rendah dari potensial redoks (II), akibatnya tinggi puncak akan lebih besar dari keadaan reaksi sempurna dan ekuivalen (keadaan ini ditunjukkan oleh Gambar 3 pada laju alir 0,640 ml/mnt

dan dengan panjang jalur 20, 10 dan 5 cm pada kadar vitamin C di atas 0,002 N). Jika waktu dispersi terlalu lama berlaku sebaliknya, yaitu tinggi puncak bukan sebanding dengan (I), tetapi tergantung pada sisa reaktan (II), akibatnya nilai tinggi puncak lebih rendah dari keadaan reaksi sempurna dan ekuivalen (keadaan ini ditunjukkan oleh Gambar 3 pada laju alir 0,185 ml/mnt untuk semua kadar dan panjang jalur reaksi, serta pada laju alir 0,640 ml/mnt khusus untuk panjang jalur 10 dan 5 cm untuk kadar 0,001 dan 0,002 N).

Perbandingan hasil analisis menggunakan IBM-PC/XT dan Pentium-PC

Sistem serial diterapkan pada komputer Pentium-PC dan sistem paralel diterapkan pada komputer IBM-PC/XT. Tabel I memperlihatkan kemantapan garis dasar pada penggunaan komputer IBM-PC/XT dan Pentium-PC yang dinyatakan dalam S/N yaitu besarnya sinyal, akibat suntikan vitamin C pada kadar terkecil yang masih terdeteksi, dibagi tiga kali SD derau.

Tabel I Perbandingan S/N tinggi puncak hasil analisis *real-time* dengan IBM-PC/XT dan Pentium-PC

| No percobaan | S/N | |
|--------------|-----------|------------|
| | IBM-PC/XT | Pentium-PC |
| 1. | 4,2 | 75,8 |
| 2. | 7,8 | 7,8 |
| 3. | 4,8 | 4,9 |
| 4. | 13,8 | 17,6 |
| 5. | 5,0 | 11,3 |

Nilai terkecil untuk S/N adalah berurutan, 4,2 untuk IBM-PC/XT, sedangkan untuk Pentium-PC adalah 4,9. Uji *paired-t* (Zar, 1974). kedua pasang nilai S/N menunjukkan bahwa perbedaan variasi oleh kedua jenis komputer ini tidak bermakna ($P > 0,05$).

Tabel II Perbandingan RSD tinggi puncak hasil analisis *real-time* dengan IBM-PC/XT dan Pentium-PC

| Kadar larutan baku (N) * | RSD (%) | |
|-----------------------------|-----------|------------|
| | IBM-PC/XT | Pentium-PC |
| 0,100 | 1,21 | 1,01 |
| | 2,46 | 2,39 |
| 0,050 | 0,68 | 0,70 |
| | 1,03 | 1,06 |
| 0,020 | 1,09 | 0,87 |
| | 1,10 | 1,23 |
| 0,010 | 0,74 | 1,58 |
| | 2,07 | 2,33 |
| 0,005 | 3,48 | 3,34 |
| | 2,35 | 2,37 |
| 0,002 | 3,19 | 3,17 |
| | 2,34 | 2,57 |
| 0,001 | 3,05 | - |
| | 2,55 | 2,82 |

* dua kali penetapan ulang, masing-masing lima replikasi suntikan
- tidak terdeteksi

Tabel II memperlihatkan perbandingan RSD tinggi puncak akibat suntikan ulang dari berbagai kadar analit pada penggunaan komputer IBM-PC/XT dan Pentium-PC. Uji *paired-t* (Zar, 1974).

kedua pasang nilai RSD menunjukkan bahwa perbedaan variasi oleh kedua jenis komputer ini tidak bermakna ($P > 0,05$).

Terapan sistem untuk penetapan kadar sampel tiruan

Tabel III memperlihatkan perbandingan % perolehan kembali dan % galat hasil analisis sampel tiruan secara *real-time* dengan IBM-PC/XT dan Pentium-PC. Rentang % perolehan kembali pada IBM-PC/XT adalah 98,86 – 102,95%, sedangkan untuk Pentium-PC 99,46 – 103,37%. Uji *paired-t* kedua pasang perolehan kembali ini menunjukkan bahwa perbedaan variasi ini tidak bermakna ($P > 0,05$). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa desain peralatan yang dibuat dapat memakai komputer IBM-PC/XT atau yang lebih canggih, yaitu Pentium, dengan hasil yang sama baik. Perlu dicatat bahwa hubungan linier antara tinggi puncak adalah dengan log kadar, sehingga galat hasil analisis dengan suntikan tunggal lebih besar dari galat replikasi suntikan sampel.

Tabel III Perbandingan galat hasil analisis sample tiruan secara ASA *real-time* dengan IBM-PC/XT dan Pentium-PC*

| Kadar analit (N) | IBM-PC/XT | | Pentium-PC | |
|------------------|------------|-----------|------------|-----------|
| | % Recovery | Galat (%) | % Recovery | Galat (%) |
| 0,020 | 102,95 | +2,95 | 103,37 | +3,37 |
| | 100,13 | +0,13 | 100,07 | +0,07 |
| 0,010 | 100,51 | +0,51 | 100,68 | +0,68 |
| 0,005 | 99,39 | -0,61 | 99,46 | -0,54 |
| | 98,86 | -1,14 | 101,43 | +1,43 |

* lima replikasi suntikan

Tabel IV memperlihatkan perbandingan lebar puncak, frekuensi suntikan, volume pereaksi pada analisis sample tiruan pada Tabel III dengan IBM-PC/XT dan Pentium-PC. Baik untuk lebar puncak, frekuensi suntikan maupun volume pereaksi memperlihatkan nilai yang hampir sama. Uji perbandingan ketiga besaran dengan *paired t-test* (Zar, 1974). menunjukkan bahwa hasil analisis dengan kedua jenis komputer ini tidak berbeda makna ($P > 0,05$). Dari Tabel IV terlihat bahwa frekuensi analisis untuk kadar 0,005 – 0,020 N adalah antara 55 – 179 suntikan/jam. Dengan kata lain jika dilakukan 5 kali replikasi suntikan ulang maka kecepatan analisisnya adalah antara 11 – 35 sampel/jam dan tiap sampel hanya memerlukan larutan pereaksi sebesar 1,1 – 3,6 ml. Dengan demikian teknik analisis ini lebih hemat pereaksi dan lebih cepat dari pada cara titrasi.

Tabel IV Perbandingan lebar puncak, frekuensi suntikan, volume pereaksi pada analisis sample tiruan pada Tabel III

| Kadar analit (N) | Lebar puncak (detik) | | Frekuensi suntikan (suntikan/jam) | | Vol pereaksi (ml) untuk 5 suntikan sample | |
|------------------|----------------------|------------|-----------------------------------|------------|---|------------|
| | IBM-PC/XT | Pentium-PC | IBM-PC/XT | Pentium-PC | IBM-PC/XT | Pentium-PC |
| 0,020 | 28,2 | 22,2 | 85 | 108 | 2,3 | 1,8 |
| | 44,6 | 43,2 | 54 | 55 | 3,6 | 3,6 |
| 0,010 | 35,4 | 34 | 68 | 70 | 2,8 | 2,7 |
| 0,005 | 17,6 | 13,4 | 137 | 179 | 1,4 | 1,1 |
| | 27,4 | 26,4 | 88 | 90 | 2,2 | 2,1 |

Menilik pada rentang linieritas kurva baku sebesar 2 dekade, yaitu dari 0,001 – 0,100 N, maka sistem ASA bipotensiometri ini dapat menjangkau kadar vitamin C lebih lebar dari cara penetapan kadar dengan pereaksi yang sama secara spektrofotometri, yaitu sebesar 180-270 μg (Burger and Gasparec, 1973).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan penyuntikan sebesar 25 μ L maka, rentang linieritasnya adalah 2,2 – 220 μ g.

Burger *and* Gasparec (1973), juga menyatakan bahwa reaksi penetapan kadar tersebut tidak diganggu oleh glukosa, urea, asam tartrat dan asam sitrat sampai kadar senyawa ini 200 kali kadar vitamin C. Sedangkan gangguan oleh kreatin terjadi jika kadarnya 50 kali dan gangguan kreatinin terjadi jika kadarnya lebih dari dua kali. Untuk vitamin C dalam tanaman perlu pula diperhatikan adanya gangguan asam oksalat.

Dari hasil penelitian ini dan pernyataan di atas maka dapat disimpulkan bahwa sistem ASA bipotensiometri ini dapat dipakai sebagai metode alternatif penetapan kadar vitamin C dalam sediaan farmasi, makanan, minuman, bahan alam (yang kandungan oksalatnya tidak besar)..

Pada penggunaan komputer IBM-PC/XT laju pemetikan sinyal maksimum adalah 1 kali/detik, sehingga untuk reaksi cepat laju pemetikan ini masih jauh tertinggal. Oleh karena itu penggunaan komputer yang lebih cepat seperti Pentium diharapkan akan memperoleh laju pemetikan yang lebih besar, pola sinyal/puncak yang sangat terkait dengan reaksi bertingkat dapat lebih mudah dipelajari. Dengan Turbo BASIC ternyata laju pemetikan dengan Pentium Celeron dapat ditingkatkan mejadi 5 kali/detik, jika data sinyal pada saat yang sama juga harus divisualisasikan di layar pantau. Dengan frekuensi pemetikan sinyal yang lebih tinggi diharapkan sistem analisis alir ini dapat digunakan mempelajari besarnya gangguan senyawa lain terhadap penetapan kadar vitamin C, mengingat bahwa senyawa pengganggu mempunyai kecepatan reaksi yang berbeda, sehingga adanya reaksi bertingkat dapat dideteksi oleh komputer dengan kecepatan pemetikan data yang lebih besar.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sistem ASA bipotensiometri yang dibuat dapat digunakan untuk penetapan kadar vitamin C, dengan kemampuan sebagai berikut.

Kemantapan sinyal jika menggunakan IBM-PC/XT tidak berbeda dengan penggunaan PC Pentium. S/N terkecil dari nilai sinyal suntikan larutan vitamin C 0,001 N adalah 4,2.

Kondisi penetapan optimum dicapai dengan pipa manifold berdiameter dalam 0,8 mm, panjang jalur reaksi 50 cm, pada laju alir 0,640 ml/menit. Pada kondisi ini dicapai hubungan linier antara log (kadar vitamin C) vs tinggi puncak, pada rentang kadar 0,001 N – 0,100 N dengan koefisien korelasi dari persamaan garis regresinya 0,9999, serta RSD tinggi puncak suntikan ulang kurang dari 3,5% dan untuk replikasi suntikan 5 kali bagi penetapan kadar satu sample paling banyak memerlukan larutan pereaksi 3,6 ml. Terapan sistem untuk penetapan kadar sample tiruan menghasilkan perolehan kembali 98,86 – 102,96% dan mempunyai galat analisis kurang dari 3% untuk komputer PC-XT, serta perolehan kembali 99,46 – 103,37% dan galat kurang dari 3,4% untuk komputer Pentium.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia atas pembiayaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Arya, S.P., Mahajan, M, and Jain, P., 1998, Photometric Methods for the Determination of Vitamin C, *Anal. Sci.* , 14(5), 889-895
- Burger, N.and Gasparec, V.K., 1973, *Talanta*, 20, 782 in Arya, S.P., Mahajan, M, and Jain, P., 1998, Photometric Methods for the Determination of Vitamin C, *Anal. Sci.* , 14(5), 889-895
- Harjana, Imam Siswanto, Muzakki, Soemardi, Bambang Supriyanto, 1997, PC-titrator : Alternatif teknik analisis ramah lingkungan, Laporan RUT-V tahun I.
- Hasebe, T. and Kawashima, T., 1996, Flow Injection Determination of Ascorbic Acid by Iron(III) Catalyzed Lucigenin Chemiluminescence in a Micellar System, *Anal. Sci.* , 12(5), pp. 773-8
- Huang, H., Cai, R., Korenaga, T., Zhang, X., Yang, Y., Du, Y. and Zeng , Y., 1997, Micelle Enhanced Spectrofluorimetric Determination of L-ascorbic, Acid Based on Laccase-linked Coupling Reaction Using Flow-injection Stopped-flow Technique, *Anal. Sci.* . 13(suppl), pp., 67-70

- Sano, T. Kuwayama, M. Furukawa, S. Takitani and. Nakamura, H., 1995 , Determination of L-Ascorbic Acid by a Flow Injection Analysis with Copper(II)-Mediated Electrochemical Detection, *Anal. Sci.* , 12(3), pp. 405
- Veltsistas, P.G, Sikalos, T.I., Prodromidis, M I., Papadimitriou, C.D., Karayannis, M.I., 2000, Construction of a Triphenyltetrazolium Liquid Membrane Ion Selective Electrode and its Analytical Application to the Assay of Vitamin C, *Mikrochim. Acta.*, 135(1-2), pp 113-117
- Yu, A.M., He, C.X, Zhou, J, Chen, H.Y., 1997, Flow injection analysis of ascorbic acid at a methylene green chemically modified, *Mikrochimica Acta*, Vol. 357(1), pp 84-85
- Zar, J.H., 1974, *Biostatistical Analysis*, 1st ed. Prentise Hall, Inc, Sydney, pp. 198-234.