

**VALIDASI METODE ANALISIS KCKT FASE TERBALIK PADA
PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL EKSTRAK
ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)**

SKRIPSI



**Oleh :
Sindi Anggraiyani
NIM. 19040129**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2023**

**VALIDASI METODE ANALISIS KCKT FASE TERBALIK PADA
PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL EKSTRAK
ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)**

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh :
Sindi Anggraiyani
NIM. 19040129

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2023**

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi ini telah diperiksa oleh pembimbing dan telah disetujui untuk mengikuti seminar hasil pada Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan

Universitas dr. Soebandi

Jember, 08 Agustus 2023

Pembimbing Utama



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm

NIDN.0703068903

Pembimbing Anggota



Aliyah Purwanti, M.Si

NIDN.0709129002

HALAMAN PENGESAHAN

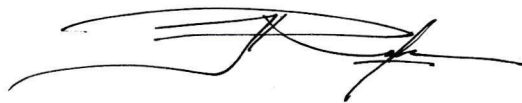
Skripsi yang berjudul “Validasi Metode Analisis KCKT Fase Terbalik Pada Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)” telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada :

Hari : Rabu

Tanggal : 30 Agustus 2023

Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas dr. Soebandi

Ketua Penguji



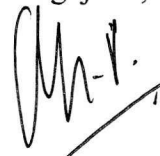
Mohammad Rofik Usman, M.Si
NIDN.0705019003

Penguji II,



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm
NIDN.0703068903

Penguji III,



Aliyah Purwanti, M.Si
NIDN.0709129002

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas dr. Soebandi



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm
NIDN. 0703068903

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Sindi Anggraiyani

NIM : 19040129

Program Studi : Sarjana Farmasi

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau hasil tulisan orang lain.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain atau ditemukan adanya pelanggaran terhadap etika keilmuan dalam skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Jember, 08 Agustus 2023

Yang menyatakan,



(Sindi Anggraiyani)

SKRIPSI

VALIDASI METODE ANALISIS KCKT FASE TERBALIK PADA PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)

Oleh :

**Sindi Anggraiyani
NIM. 19040129**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm

Dosen Pembimbing Anggota : Aliyah Purwanti, M.Si

HALAMAN PERSEMBAHAN

Tiada lembar yang paling indah dalam laporan skripsi ini kecuali lembar persembahan. Alhamdulillahirobbil'alamin, dengan mengucapkan syukur atas rahmat Allah SWT dan sebagai ucapan terimakasih skripsi ini dengan sepenuh hati saya persembahkan kepada :

1. Teristimewa penulis sampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada Bapak M. Ridwan dan Ibunda Astina tercinta, Orang tua hebat yang selalu menjadi penyemangat penulis dari kerasnya dunia perantauan. Orang tua terbaik sepanjang masa, banyak hal baik yang engkau ajarkan semasa ayuk hidup. Terimakasih tak terhingga atas segala perjuangannya, perhatian, pelajaran, perlindungan, dukungan, doa dan ridhonya serta bimbingannya hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
2. Adik-adikku Putri Wulandari, Riski Prayuda, Riska Septiani, dan Nopa Amilia. Terimakasih kepada keempat adikku sudah menguatkan, mensupport, doa dan semangat selama perjalanan kuliah penulis hingga skripsi ini selesai. Tumbuhlah menjadi versi paling hebat adik-adikku.
3. Keluargaku di Palembang (unggang H. Nurdin alm dan umeh Hj. Nurdiah almh. serta mamang dan bibik) dan keluarga lainnya. Terimakasih sudah menghantarkan penulis berada ditempat ini hingga bisa menyelesaikan skripsi ini. Dan tak lupa juga baik dukungan moril maupun materil untuk penulis.
4. Keluargaku di Jember (Buyut, mbah, serta Om dan Tante) dan keluarga lainnya. Terimakasih atas kasih sayang serta cintanya selama di Jember.

Terimakasih sudah selalu membimbing dan mensupport penuh penulis hingga skripsi ini selesai dengan baik.

5. Ibu apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku dosen pembimbing utama, Ibu Aliyah Purwanti, M.Si selaku dosen pembimbing anggota, dan Bapak Mohammad Rofik Usman, M.Si selaku ketua penguji. Terimakasih telah banyak meluangkan waktu, memberikan bantuan, saran, dan bimbingannya dalam penyusunan skripsi ini.
6. Segenap Ibu dan Bapak Dosen Program Studi Sarjana Farmasi yang telah memberikan banyak pengalaman dan ilmunya selama perkuliahan, terutama Ibu apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm. selaku wali kelas dan DPA yang sangat sabar membimbing saya selama perkuliahan. Serta staf Laboran Farmasi yang membantu kelancaran dalam proses penyelesaian skripsi ini.
7. Teman-teman terdekat penulis selama diperantauan. Terimakasih atas segala canda, tawa, pengalaman, perjuangan serta sudah banyak meluangkan waktu bersama, menemani, dan membantu penulis selama dibangku perkuliahan. Terimakasih atas kenangan serta banyak moment yang sudah kita lalui bersama. *See you on top, guys.*
8. Seluruh teman-teman angkatan 19 Farmasi terutaman kelas 19C. Terimakasih telah banyak memberikan pengalaman serta perjuangan yang sudah kita lewati bersama selama dibangku kuliah ini. *Success for us, guys.*
9. Dan yang terakhir untuk Sindi Anggraiyani. Terimakasih sudah mau menepikan ego dan memilih untuk kembali bangkit hingga menyelesaikan semua ini.

MOTTO

“Long story short, i survived”

-Taylor Swift-

Jika kamu berbuat baik kepada orang lain (berarti) kamu berbuat baik kepada dirimu sendiri. Dan jika kamu berbuat jahat, maka (kerugian kejahatan) itu untuk dirimu sendiri.

-QS. Al-Isra' : 7-

ABSTRAK

Anggraiyani, Sindi* Setyaningrum, Lindawati Purwanti, Aliyah***. 2023.** Validasi Metode Analisis KCKT Fase Terbalik Pada Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.). **Skripsi. Program Studi sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.**

Biji kakao (*Theobroma cacao* L.) mengandung senyawa yang berpotensi di Indonesia. Salah satunya adalah golongan alkaloid yang mempunyai turunan kafein yang berperan untuk meningkatkan fokus / konsentrasi. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan salah satu metode yang digunakan untuk pemisahan senyawa secara selektif dalam suatu sampel dengan parameter selektivitas, linieritas, LOD & LOQ, presisi, dan akurasi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui dan mendapatkan kondisi optimum KCKT fase terbalik yang meliputi laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang, agar memenuhi validasi metode analisis serta untuk mengetahui kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao. Desain penelitian ini adalah deskriptif ekperimental laboratorium dengan sampel yang digunakan adalah serbuk biji kakao. Kondisi KCKT dengan fase diam kolom *poroshell* C-18 untuk validasi metode analisis dan penetapan kadar alkaloid total pada ekstrak kakao biji kakao yang digunakan merupakan hasil optimasi metode analisis yaitu laju alir 1,0 mL/menit, fase gerak metanol:*aquabidesilata* (30:70) diamati pada panjang gelombang 272 nm. Hasil penelitian menunjukkan uji validasi memenuhi persyaratan parameter yang meliputi uji presisi %KV 0,055%, uji akurasi menghasilkan % *recovery* berkisar 100%, selektivitas yang baik, linieritas dengan $r = 0,9998$ serta nilai $V_{x0} = 0,552$ %, LOD 31.618 ppm dan LOQ 105.396 ppm. Rata-rata kadar alkaloid total yang diperoleh 3,395. Penelitian dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang telah divalidasi dapat diaplikasikan pada penetapan kadar alkaloid total dalam ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

Kata Kunci: Biji kakao, alkaloid, KCKT, validasi metode, dan penetapan kadar

*Peneliti

**Pembimbing 1

***Pembimbing 2

ABSTRACT

Anggraiyani, Sindi* Setyaningrum, Lindawati** Purwanti, Aliyah***. 2023. **Validation of the Reverse Phase HPLC Analysis Method in Determining Total Alkaloid Content of Ethanol Extract of Cocoa Seeds (*Theobroma cacao* L.)**. Essay. Pharmacy Undergraduate Study program, University of dr. Soebandi.

Cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) contain compounds that have potential in Indonesia. One of them is a group of alkaloids which have caffeine derivatives which play a role in increasing focus/concentration. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is a method used for the selective separation of compounds in a sample with parameters of selectivity, linearity, LOD & LOQ, precision and accuracy. The purpose of this study was to determine and obtain the optimum conditions for the reversed phase of HPLC which includes flow rate, mobile phase, and wavelength in order to meet the validation of the analytical method and to determine the total alkaloid content in the ethanol extract of cocoa beans. The design of this study was a descriptive laboratory experiment with cocoa bean powder as the sample. The HPLC condition with the stationary phase of the C-18 shaft shell column for validating the analytical method and determining the total alkaloid content in the cocoa extract of cocoa beans used is the result of optimizing the analytical method, namely a flow rate of 1.0 mL/minute, the mobile phase is methanol:aquabidesilata (30:70) was observed at a wavelength of 272 nm. The results showed that the validation test met the parameter requirements which included a precision test of %KV 0.055%, an accuracy test resulting in % recovery around 100%, good selectivity, linearity with $r = 0.9998$ and a value of $V_{x0} = 0.552$ %, LOD 31,618 ppm and LOQ 105,396 ppm. The average total alkaloid content obtained was 3.395. It can be concluded that the validated analytical method can be applied to the determination of total alkaloid content in the ethanol extract of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.).

Keywords: Cocoa beans, alkaloids, HPLC, method validation and determination of levels

*Author

**Advisor 1

***Advisor 2

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi ini disusun dengan judul “Validasi Metode Analisis KCKT Fase Terbalik Pada Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)”.

Selama proses penyusunan skripsi ini penulis dibimbing dan dibantu oleh berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

- 1) Andi Eka Pranata, S.ST., S.Kep., M.Kes. selaku Rektor Universitas dr. Soebandi
- 2) apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm. selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
- 3) apt. Dhina Ayu Susanti, S.Farm., M.Kes. selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
- 4) apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm. selaku pembimbing utama
- 5) Aliyah Purwanti, M.Si. selaku pembimbing anggota
- 6) Mohammad Rofik Usman, S.Si., M.Si. selaku penguji utama

Dalam penyusunan skripsi ini penulis menyadari masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan di masa mendatang.

Jember, 08 Agustus 2023

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman Sampul	i
Halaman Judul	ii
Halaman Persetujuan	iii
Halaman Pengesahan.....	iv
Halaman Pernyataan Orisinalitas	v
Halaman Pembimbing Skripsi	ii
Halaman Persembahan.....	vii
Motto	ix
Abstrak	x
Abstract	xi
Kata Pengantar	xii
Daftar Isi	xiii
Daftar Tabel.....	xvi
Daftar Gambar	xvii
Daftar Lampiran	xviii
Daftar Singkatan	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.5 Keaslian Penelitian	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1 Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	10
2.1.1 Klasifikasi Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	10
2.1.2 Morfologi Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	11
2.1.3 Kandungan Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	12
2.1.4 Manfaat Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	13
2.2 Ekstraksi	13
2.2.1 Tinjauan tentang ekstrak.....	17
2.3 Pelarut.....	17
2.3.1 Kloroform	18
2.3.2 Asam Asetat.....	19
2.3.3 Metanol	19
2.3.4 Aseton	19
2.3.5 Etanol.....	20
2.4 Senyawa Alkaloid	20
2.4.1 Struktur Alkaloid	22
2.4.2 Sifat Umum Alkaloid.....	22
2.4.3 Klasifikasi Alkaloid	23
2.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	25
2.5.1 Pengertian KCKT	25

2.5.2	Prinsip Kerja KCKT	25
2.5.3	Keuntungan KCKT	26
2.5.4	Bagian-bagian KCKT	27
2.5.5	Jenis-jenis KCKT.....	30
2.6	Validasi Metode Analisis	33
2.6.1	Selektivitas.....	35
2.6.2	Linieritas	36
2.6.3	Batas Deteksi (LOD)	37
2.6.4	Batas Kuantifikasi (LOQ).....	38
2.6.5	Akurasi.....	38
2.6.6	Presisi.....	39
2.6.7	Uji Kesesuaian Sistem	40
2.7	Penetapan Kadar Alkaloid Total	42
BAB 3	KERANGKA KONSEP.....	43
3.1	Kerangka Konseptual	43
3.2	Hipotesis.....	44
BAB 4	METODE PENELITIAN.....	45
4.1	Desain Penelitian.....	45
4.2	Populasi dan Sampel	45
4.2.1	Populasi.....	45
4.2.2	Sampel	46
4.3	Variabel Penelitian	46
4.3.1	Variabel bebas (<i>Independent</i>)	46
4.3.2	Variabel terikat (<i>Dependent</i>)	46
4.4	Tempat Penelitian.....	46
4.5	Waktu Penelitian	46
4.6	Definisi Operasional.....	47
4.7	Teknik Pengumpulan Data	48
4.7.1	Determinasi Tanaman	48
4.7.2	Ekstraksi Maserasi	48
4.7.3	Identifikasi Senyawa Alkaloid.....	49
4.7.4	Partisi Cair-Cair	50
4.7.5	Pembuatan fase gerak	50
4.7.6	Pembuatan Pelarut	50
4.7.7	Pembuatan Larutan Baku Kafein.....	51
4.7.8	Optimasi KCKT.....	51
4.7.9	Uji Kesesuaian Sistem	52
4.7.10	Validasi metode analisis.....	52
4.8	Penetapan Kadar Alkaloid Total	54
4.9	Aplikasi Metode Analisis Pada Penetapan Kadar Alkaloid Total.....	55
BAB 5	HASIL PENELITIAN	56
5.1	Data Umum	56
5.1.1	Determinasi Tanaman	56
5.1.2	Ekstraksi Sampel	56
5.1.3	Partisi Cair-cair.....	56
5.1.4	Identifikasi Alkaloid	56

5.2 Data Khusus	57
5.2.1 Optimasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	57
5.2.2 Uji Kesesuaian Sistem (UKS)	59
5.2.3 Validasi Metode Analisis.....	60
5.2.4 Penetapan Kadar Alkaloid Total.....	65
BAB 6 PEMBAHASAN	66
6.1 Determinasi dan Ekstraksi Sampel Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	66
6.2 Identifikasi Alkaloid.....	69
6.3 Optimasi KCKT	70
6.4 Uji Kesesuaian Sistem.....	72
6.5 Validasi Metode Analisis	72
6.6 Penetapan Kadar Alkaloid Total	76
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	79
7.1 Kesimpulan.....	79
7.2 Saran.....	79
DAFTAR PUSTAKA	81
LAMPIRAN.....	87

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian.....	9
Tabel 2.1 Jenis pelarut dan komponen terlarut serta titik didihnya	18
Tabel 4.1 Definisi Operasional	47
Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	56
Tabel 5.2 Hasil Perhitungan Rendemen Partisi	56
Tabel 5.3 Uji Identifikasi Alkaloid	57
Tabel 5.4 Optimasi laju alir.....	57
Tabel 5.5 Penentuan fase gerak.....	58
Tabel 5.6 Uji kesesuaian sistem (UKS)	59
Tabel 5.7 Selektivitas	60
Tabel 5.8 Linieritas	61
Tabel 5.9 LOD & LOQ	62
Tabel 5.10 Presisi	63
Tabel 5.11 Akurasi	64
Tabel 5.12 Penetapan kadar alkaloid total	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	10
Gambar 2.3 Struktur Senyawa Alkaloid	22
Gambar 2.4 <i>Morphin, Nicotine, Atrophin.</i>	24
Gambar 2.5 <i>Ephedrine, Hordenine, Mescaline.</i>	24
Gambar 2.6 <i>Caffeine, Theophylline, Theobromine.</i>	25
Gambar 2.7 Diagram sistem KCKT	27
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual	43
Gambar 5.2 Isoplot 2D panjang gelombang 272 nm	59
Gambar 5.3 Kurva Baku Linieritas	61
Gambar 5.4 Kurva Baku LOQ & LOQ	63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Jadwal Penyusunan Naskah Skripsi	88
Lampiran 2 <i>Certifikat Of Analysis Caffein</i>	89
Lampiran 3 Sertifikat Kloroform	90
Lampiran 4 Surat Hasil Deterinasi Tanaman	91
Lampiran 5 Ekstraksi Maserasi Biji Kakao	92
Lampiran 6 Rendemen Ekstrak Etanol 96% Biji Kakao.....	93
Lampiran 7 Identifikasi Alkaloid	94
Lampiran 8 Partisi Cair-Cair	95
Lampiran 9 Perhitungan Larutan Induk Kafein	96
Lampiran10 Perhitungan Linieritas, LOD Dan LOQ	97
Lampiran 11 Perhitungan Penentuan Presisi Dan Akurasi	98
Lampiran 12 Perhitungan Validasi Metode Presisi Dan Akurasi	99
Lampiran 13 Perhitungan Penetapan Kadar Alkaloid Total	100
Lampiran 14 Kromatogram Laju Alir	102
Lampiran 15 Kromatogram Fase Gerak.....	105
Lampiran 16 Kromatogram Validasi Metode	108
Lampiran 17 Kromatogram Penetapan Kadar Alkaloid Total	135

DAFTAR SINGKATAN

cm	= Sentimeter
FP	= Faktor Pengenceran
GC	= Gas Chromatography
HPLC	= <i>high performance liquid chromatography</i>
ICH	= <i>International Conference on Harmonization</i>
KCKT	= Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
LDL	= <i>Low-density Lipoprotein</i>
LOD	= <i>limit of detection</i>
LOQ	= <i>limit of quantitation</i>
m	= Meter
MDA	= <i>Molandaldehyd</i>
mL	= Mililiter
mm	= Millimeter
N	= Normalitas
nm	= Nanometer
pH	= Potential Hydrogen
ppm	= <i>Part Per Million</i>
Puslitkoka	= Pusat Penelitian Kopi dan Kakao
rpm	= <i>Revolution Per Minute</i>
RSD	= <i>Relative Standard Deviation</i>
SRM	= <i>Standard Reference Material</i>
SST	= <i>System Suitability Test</i>
USP	= <i>United States Pharmacopoeia</i>
UV-Vis	= <i>Ultraviolet-visible</i>
μL	= Mikroliter

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu tanaman yang berperan penting dalam perekonomian Indonesia. Indonesia menduduki urutan ketiga terbesar di Dunia dengan produksi kakao sebanyak 240.000 ton setelah Pantai Gading dan Gana di Afrika Barat (Aryani, *et al.*, 2018). Salah satu produsen buah kakao yang terdapat di Indonesia adalah Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia (PUSLITKOKA) yang didirikan sejak 1 Januari 1911 pada masa kolonial belanda yang berada di Kota Jember Provinsi Jawa Timur. Pusat penelitian ini memproduksi sebanyak 2000 ton kakao (Felicia, *et al.*, 2016). Konsumsi kakao di Indonesia akan terus tumbuh menjadi sebesar 684,83 ribu ton pada tahun 2021, dengan tingkat pertumbuhan rata-rata 7,98% per tahun (Kementerian Pertanian, 2019).

Indonesia merupakan salah satu penghasil dan pengekspor kakao terbesar di dunia dan juga mengimpor biji kakao. Selain itu, Indonesia juga mengimpor biji kakao yang berasal dari afrika dengan tujuan memenuhi pengolahan dalam proses pencampuran biji kakao sehingga menghasilkan cita rasa yang *milky* dan aroma yang kuat (Hadinata and Marianti, 2020). Biji kakao dapat diolah menjadi berbagai produk dengan nilai tambah yang lebih tinggi. Biji kakao mengandung berbagai kandungan antara lain protein, lemak, karbohidrat, senyawa polifenol, flavonoid dan *methyloxanthine* (Rodriguez, *et al.*, 2012).

Biji kakao mengandung dua jenis alkaloid utama yaitu *theobromine* dan *caffeine*. Keduanya merupakan pengencer methylxan yang terkenal yang ada dalam kakao dan produk turunan kakao (Rojo-Poveda, *et al.*, 2021). *Methylxanthine* adalah turunan *xanthine* yang mengandung gugus metil, yang meliputi kafein, teobromin, dan teofilin (Meng *et al.*, 2009). Pada biji kakao mengandung kafein sebanyak 0,07-0,36% (Sudibyo, 2012), sedangkan pada *theobromine* merupakan senyawa yang paling melimpah pada biji kakao, dengan kandungan 1-4% (Lim, 2012). Diketahui juga bahwa biji kakao mengandung berbagai jenis senyawa termasuk alkaloid, lemak, protein, pati, monosakarida, amina biogenik, alkaloid isokuinolin, tanin katekin dan oksalat (Alfrida, 2018).

Theobromine adalah stimulan yang lebih lemah daripada kafein dan mempunyai efek pada jantung dan sistem saraf. Selain itu pada kafein adalah stimulan yang sering digunakan untuk meningkatkan fokus atau konsentrasi dan memperbaiki suasana hati. Kedua alkaloid ini juga dikenal karena memiliki efek anti-inflamasi dan antioksidannya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsumsi dalam bentuk minuman kakao atau *dark chocolate* dalam jumlah sedikit dapat lebih memperlancar sistem peredaran darah atau mengukur kemampuan pembuluh darah untuk mengendurkan dan mempercepat adaptasi peredaran darah (Melisa Darmawan dkk., 2020). Menurut sebuah studi ditemukan bahwa konsumsi kakao meningkatkan aliran darah otak, berperan dalam pengobatan penyakit otak seperti demensia dan stroke terutama pada pria (Latif, 2013).

Alkaloid adalah metabolit yang paling umum memiliki atom nitrogen sekunder yang ditemukan di jaringan tumbuhan dan hewan. Sebagian besar

senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan. Alkaloid terdapat pada berbagai bagian tumbuhan seperti bunga, biji, daun, ranting, akar dan kulit batang (Hartati, 2010). Alkaloid adalah sekelompok senyawa alami yang memiliki implikasi di bidang kesehatan yang penting. Alkaloid memiliki efek farmakologis yang kuat pada sistem mamalia serta organisme lain, oleh karena itu alkaloid memiliki efek terapeutik yang penting. Morfin, atropin, vinkristin dan kina merupakan contoh alkaloid yang memiliki efek terapeutik sebagai agen antimalaria dan antikanker. Oleh karena itu, penentuan kandungan alkaloid sangat penting untuk kualitas tanaman obat (Shamsa *et al.*, 2008).

Salah satu metode yang digunakan untuk pengambilan senyawa alkaloid dalam biji kakao dilakukan dengan cara ekstraksi. Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan pelarut yang sesuai. Teknik ini secara selektif melarutkan satu atau lebih senyawa dalam pelarut yang sesuai. Larutan dari senyawa terlarut ini disebut ekstrak (Chaugule *et al.*, 2019). Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi yang dilakukan dengan proses perendaman bahan dalam pelarut yang sesuai agar zat aktif terserap dengan sedikit atau tanpa proses pemanasan. Keuntungan dari metode ini adalah tidak memerlukan suhu tinggi dan karena itu cocok untuk ekstraksi bahan yang tidak panas (senyawa yang mudah menguap) (Laily, 2016).

Penelitian ini juga menggunakan metode ekstraksi cair-cair untuk mengekstraksi senyawa tunggal dari golongan alkaloid. Ekstraksi cair-cair adalah pemisahan komponen kimia antara dua fase pelarut yang tidak bercampur (pelarut organik dan air), dengan beberapa komponen larut pada fase pertama dan

beberapa pada fase kedua. Senyawa kimia dipisahkan menjadi dua fase sesuai kepolarannya dengan perbandingan konsentrasi yang tetap (Masfufah, 2016). Ekstrak yang didapatkan dari hasil ekstraksi proses sebelumnya akan dilakukan penetapan kadar alkaloid total dan dianalisis dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik.

Beberapa metode untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa alkaloid pada tanaman antara lain metode HPLC, fluorometri, kromatografi ion, kolorimetri, GC dan KLT (Aksara, *et al.*, 2013; Altun, 2002; Chen & Wang, 2001; Katayama & Taniguchi, 1989; Pagliarussi, *et al.*, 2002; Qing-qin *et al.*, 2002). Penelitian mengenai penetapan kadar alkaloid total dalam ekstrak etanol bunga lawang (*Illicium verum Hook.f*) dengan Spektrofotometri UV-Vis pernah dilakukan oleh (Danila, 2022) dan pada penelitian Setyaningrum *et al.*, (2022) dengan metode analisis HPLC untuk penentuan kandungan alkaloid total dalam ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) dengan fase gerak asetonitril: metanol: *aqua bidestillata* (80:5:15), serta penelitian lainnya pernah dilakukan oleh Czech *et al.*, (2011) terhadap theobromine dan kafein dalam kopi dengan menggunakan fase gerak campuran buffer amonium asetat 20 mM pH 7,5 dan metanol (80:20), kolom C₁₈ Phenomenex Kinetex 2,6 µm dan laju alir 1,0 mL/menit. Hasil penelitian ini menunjukkan linieritas yang baik, namun teobromin tidak dapat dipisahkan dari matriks sampel.

Berdasarkan deskripsi penelitian sebelumnya belum ada penelitian terhadap penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan metode validasi analisis KCKT fase terbalik. Oleh karena itu, penelitian

ini dilakukan untuk mendapatkan metode yang memenuhi parameter-parameter validasi. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), pemilihan yang didasarkan pada keunggulan KCKT yang mampu memisahkan senyawa tunggal yang diinginkan dan mendeteksi analit pada konsentrasi rendah. Prinsip kromatografi adalah pemisahan berdasarkan kepolaran analit. Fase KCKT yang digunakan adalah fase terbalik, fase terbalik adalah fase yang menggunakan fase gerak polar dan fase diam non-polar (Aulia, 2016). Sistem KCKT dipilih karena memiliki daya pisah yang baik, peka, kolom dapat digunakan kembali, dan dapat menganalisis molekul besar dan kecil (Harmita, 2004).

Dalam prosedur penetapan kadar dibutuhkan langkah sistematis sebelumnya yaitu optimasi dan validasi. Optimasi dilakukan untuk menentukan panjang gelombang optimal dari senyawa yang dianalisis. Selain itu, perlu juga mengoptimalkan komposisi fase gerak sesuai dengan komposisi yang diinginkan agar hasil pemisahan dan analisisnya optimum. Validasi dilakukan untuk mendapatkan kondisi analisis yang sesuai untuk penetapan kadar alkaloid total dalam ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan metode KCKT. Kondisi analisis yang sesuai diperoleh ketika hasil analisis memenuhi parameter yang valid seperti selektivitas, linearitas, limit deteksi, limit kuantitas, akurasi dan presisi.

Pada penelitian sebelumnya belum ditemukan peneliti yang melakukan validasi dan penetapan kadar pada senyawa utama golongan alkaloid yaitu kafein terutama pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan KCKT. Oleh karena itu,

penelitian tentang validasi metode analisis dan penetapan kadar alkaloid total pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan standar kafein. Penelitian ini dilakukan guna untuk mengetahui kadar alkaloid yang terkandung dalam biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang berasal dari PUSLITKOKA yang terletak di Jenggawah kota Jember.

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan validasi metode analisis untuk penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara KCKT Fase terbalik agar diperoleh metode analisis yang valid, akurat dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

1.2 Rumusan Masalah

- 1) Bagaimana kondisi optimum KCKT fase terbalik (laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang) pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.)?
- 2) Apakah kondisi optimasi KCKT fase terbalik yang terpilih telah memenuhi persyaratan validasi untuk melakukan penetapan kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.)?
- 3) Berapa kadar alkaloid total dalam ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara KCKT fase terbalik?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode KCKT fase terbalik pada ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L.) berdasarkan analisis data yang diperoleh dari hasil penetapan kadar alkaloid telah memenuhi

persyaratan validasi metode analisis seperti selektivitas, linieritas, limit deteksi, limit kuantitasi, akurasi dan presisi.

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1) Untuk mendapatkan kondisi optimum KCKT fase terbalik (laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang) pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.).
- 2) Untuk mendapatkan kondisi optimasi KCKT fase terbalik yang terpilih telah memenuhi persyaratan validasi untuk melakukan penetapan kadar alkaloid pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.).
- 3) Untuk mengetahui kadar alkaloid total dalam ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang ditetapkan dengan metode KCKT fase terbalik.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat bagi Peneliti

- 1) Dapat dijadikan sebagai sumber informasi bagi peneliti tentang validasi metode dan penentuan kadar dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara KCKT fase terbalik.
- 2) Dapat dijadikan sebagai sumber informasi ilmiah atau sebagai referensi bagi peneliti yang akan melanjutkan tentang validasi metode dan penentuan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara KCKT fase terbalik.

1.4.2 Manfaat bagi Mahasiswa

- 1) Dapat dijadikan sebagai referensi mahasiswa untuk proposal penelitian.
- 2) Dapat dijadikan sebagai dasar penelitian selanjutnya dalam penentuan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara KCKT fase terbalik.

1.4.3 Manfaat bagi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao

- 1) Dapat menambah referensi penelitian untuk pusat Penelitian Kopi dan Kakao.
- 2) Pusat Penelitian Kopi dan Kakao dapat mengembangkan penelitian atau kajian lebih lanjut dengan menggunakan KCKT fase terbalik untuk memvalidasi metode dan penentuan kadar ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

1.4.4 Manfaat bagi Industri

- 1) Dapat dijadikan sebagai bahan contoh dalam praktek perkuliahan.
- 2) Dapat dijadikan studi lebih lanjut validasi metode dan penentuan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan (KCKT) fase terbalik.
- 3) Dapat dijadikan sebagai acuan dalam penelitian serupa yang dilakukan oleh institusi.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

Peneliti	Tahun terbit	Judul Penelitian	Hasil Penelitian
Yulius Denis	2018	Penetapan Kadar Kafein Dalam Kopi Bubuk Murni Robusta Merek “X” Dengan Metode <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) Fase Terbalik	Hasil penelitian menunjukkan pada penetapan kadar rata-rata kadar kafein dalam 2 gram sampel kopi bubuk murni robusta merek “X” pada 6 kali replikasi dengan perlakuan <i>duplo</i> adalah $2,349 \pm 0,106$ %b/b dengan nilai CV 4,450 %. Berdasarkan BPOM sudah memenuhi batas konsumsi kafein maksimum yaitu kurang dari 50 mg/sajian atau 150 mg/hari.
Dyah Purwaning Tyas	2021	Validasi Metode Analisis dan Penetapan Kadar Kafein Menggunakan Metode KCKT Fase Terbalik pada Sampel Teh Hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur	Hasil penelitian menunjukkan pada rata-rata kadar kafein dalam 10 mg sampel produk teh hitam dari PTPN XII Lawang, Jawa Timur adalah sebesar 6,57650% b/b atau 65,76504 mg. Hal ini sesuai dengan ketentuan persyaratan BPOM yaitu batas konsumsi kafein maksimum 50 mg sampai 150 mg /hari.
Ayu Dwi Wardani	2021	Validasi Metode Dan Penentuan Kadar Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak (<i>Annona muricata</i> L.). Secara Spektrofotometri Uv-Vis Di Desa Kemiri Kabupaten Jember	Hasil penelitian yang didapat dari perhitungan dengan menggunakan persamaan $y = 0,0196x + 0,1495$ dan koefisien korelasi (r) 0,9998 dan diperoleh kadar alkaloid total dalam fraksi etil asetat daun sirsak (<i>Annona muricata</i> L.) didapatkan kadar rata-rata 4,1859% b/b.
Lindawati Setyaningrum, et al.	2022	Development and Validation of RP-HPLC Analysis Method for Determination of Total Alkaloid Content of Soursop (<i>Annona muricata</i> L.) Leaf Extract	Hasil penelitian yang didapat dari perhitungan dengan menggunakan persamaan $y = 0,75852x + 106,19513$ dengan r mendekati 1 yaitu diperoleh kadar $0,0862 \pm 0,004$ % (b/b) dari standar kafein 100% .
Devia Danila & Ellsya Angeline Rawar	2022	Penetapan Kadar Alkaloid Total dalam Ekstrak Etanol Bunga Lawang (<i>Illicium Verum</i> Hook. f) Secara spektrofotometri Uv-Vis	Hasil penetapan kadar alkaloid yang telah diperoleh dari ekstrak etanol bunga lawang sebesar 35,04 mg/g dengan persentase 3,50%.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu dari bahan baku perkebunan yang dikembangkan untuk ekspor dan kebutuhan industri makanan dan minuman dalam negeri (Sri utami *et al.*, 2018). Kakao adalah tanaman yang nama ilmiahnya adalah *Theobroma cacao* L. Kakao memiliki nama keluarga *Sterculiaceae*. Tumbuhan ini asli Amerika Selatan yang kini banyak ditanam di beberapa daerah tropis Biji yang dihasilkan merupakan produk olahan dengan nama yang sudah tidak asing lagi yaitu coklat (Bisma *et al.*, 2022).

2.1.1 Klasifikasi Kakao (*Theobroma cacao* L.)



(sumber : Pratiwi S. P., 2022)

Gambar 2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Menurut Jefrica (2022), tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kelas : *Dicotyledonae*

Subkelas : *Dialypetalae*

Divisi : *Spermatophyta*

Subdivisi : *Angiospermae*

Ordo : *Malvales*

Famili : *Sterculiaceae*

Genus : *Theobroma*

Spesies : *Theobroma cacao* L.

2.1.2 Morfologi Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Tanaman kakao tergolong tanaman tahunan (*perennial*) dan merupakan tanaman dikotil (biji berkeping dua) dengan 10 pasang kromosom. *Theobroma cacao* L. terbagi menjadi dua subjenis, yaitu *T. cacao* dan *T. sphaerocarpum* (chev). Subjenis *T. sphaerocarpum* memiliki pertumbuhan yang lebih kuat dan produktivitas yang lebih tinggi dari pada *T. cacao*. (Martono 2014).

Menurut penelitian Martono (2014), daerah asal tanaman kakao adalah hutan tropis dengan curah hujan dan kelembapan yang tinggi sehingga tanaman dapat tumbuh tinggi. Batang kakao tumbuh vertikal, tinggi tanaman kebun bervariasi antara 1,8-3 m pada umur tiga tahun dan 4,5-7 m pada umur 12 tahun, sedangkan tinggi kakao liar 20 m. Warna daun kakao bervariasi dari coklat kekeklatan, coklat kemerahan, coklat kemerahan, kemerahan, merah, merah muda, merah tua dan kuning kemerahan. Daun muda berwarna kuning, kuning muda, coklat, merah-coklat, hijau-coklat, merah-hijau dan hijau, panjang daun 10-48 cm dan lebar 4-20 cm. Selain memperkuat akar tanaman kakao, mereka menyerap air dan unsur hara yang terlarut dalam tanah dan mengangkut air dan unsur hara ke tempat yang dibutuhkan.

Tanaman kakao memiliki akar tunggang yang termasuk akar serabut dan tumbuh disekitar permukaan tanah sampai sekitar 30 cm. Pertumbuhan akar bisa 8 per meter ke samping dan 15 m ke bawah. Bunga kakao tergolong

bunga sempurna dari daun kelopak (*calyx*) sebanyak 5 helai berwarna merah muda dan benang sari (*androecium*), total 10 daun. Panjang tangkai bunga 2-4 tangkai cm. Warna tangkai bunga bervariasi dari hijau muda, hijau, kemerahan, merah muda dan merah. Dalam kondisi normal, tanaman kakao sudah bisa memproduksi bunga hingga 6000-10000 per tahun dan hanya sekitar 5% dapat menjadi buah. Buah kakao memiliki permukaan buah yang halus, cukup halus, agak kasar dan kasar dengan alur dangkal, sedang dan dalam, jumlah alur sekitar 10, dengan ketebalan 1-2 cm tergantung jenis klonnya. Panjang buah 16,2-20,50 diameter 8-10,07 cm. Biji kakao dapat dibagi menjadi tiga bagian terutama yaitu kotiledon (87,10%), kulit (12%) dan organ (0,9%). Benih yang terbentuk lonjong relatif datar, berukuran 2,5 x 1,5 cm. Biji kakao tertutup lendir (*pulp*) berwarna putih.

2.1.3 Kandungan Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Woskresensky menemukan *theobromine* dalam biji kakao pada tahun 1842 dan strukturnya ditentukan oleh Emil Fischer pada akhir abad 19. *Theobromine* berasal dari kata *theobroma*, awalnya berasal dari isomer teofilin dan dikenal sebagai senyawa xanthine dengan 2 gugus metil. Sebelum diproses (fermentasi), biji kakao mengandung teobromin sekitar 14-38 gram dan kafein 1-8 gram per kilogram berat kering biji kakao (Sepriyani, 2020).

Metabolit sekunder yang terdapat pada biji kakao berupa steroid, terpenoid, flavonoid, alkaloid, tanin dan fenolik. Biji kakao yang belum diolah memiliki sekitar 12-18 senyawa polifenol dengan kelompok utama flavanol, antosianin dan proantosianidin. Senyawa polifenol didominasi oleh

katekin dan epilokalokatekin. Polifenol dalam biji kakao juga didominasi oleh golongan flavonoid yaitu proantosianidin $\pm 58\%$, flavanol $\pm 37\%$ dan antosianidin $\pm 4\%$. Pada senyawa metabolit sekunder polifenol ini dapat digunakan sebagai antibakteri untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme pangan (Sepriyani, 2020).

2.1.4 Manfaat Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Potensi pemanfaatan biji kakao olahan dan efek kesehatannya telah dibahas di Amerika Tengah dan Eropa sejak tahun 1600-1700an. Pada tahun 1850-1900an perkembangan biji kakao olahan yang bermanfaat bagi kesehatan diterima secara luas. Selama 30-40 tahun, setelah banyak penelitian dan ditemukannya beberapa zat bermanfaat dalam biji kakao olahan, masyarakat percaya bahwa biji kakao berperan penting dalam menjaga kesehatan. Salah satu zat bermanfaat dari biji kakao olahan adalah flavonoid yang termasuk dalam sub-kelompok senyawa polifenol (Sepriyani, 2020).

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan senyawa-senyawa kimia yang larut dengan cara memisahkannya dari bahan-bahan yang tidak larut dalam cairan pelarut. Simplisia yang diekstraksi mengandung zat aktif larut dan tidak larut seperti serat pangan, karbohidrat, protein dan lain-lain. Secara sederhana, bahan aktif yang terkandung dapat dibedakan menjadi kelompok minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda mempengaruhi kelarutan dan kestabilan senyawa tersebut terhadap panas, udara, cahaya, logam berat, dan asam. Mengetahui bahan aktif yang terkandung memudahkan pemilihan pelarut

dan metode ekstraksi yang tepat (Rondang Tambun, *et al.*, 2016). Salah satu metode ilmiah untuk menemukan obat tradisional adalah ekstraksi. Metode ekstraksi merupakan metode pemisahan komponen yang bergerak dari padat ke cair atau dari cair ke cair (Santosa & Sulistiawati, 2014).

Berbagai jenis metode ekstraksi yang biasa dilakukan untuk proses penentuan senyawa sebagai berikut :

1) Maserasi

Maserasi merupakan metode pemisahan komponen yang tidak melalui proses pemanasan atau cukup dengan merendam bahan dalam pelarut pada suhu ruang (Susanty & Bachmid, 2016). Maserasi dilakukan dengan cara merendam tanaman simplisia dengan pelarut tertentu dalam wadah tertutup tanpa ada celah kemudian didiamkan pada suhu ruang (Mukhriani, 2014). Waktu terbaik untuk proses perendaman adalah 24-48 jam untuk mendapatkan hasil rendaman yang baik (Chairunnisa *et al.*, 2019). Keuntungan dari proses maserasi adalah lebih sederhana karena tidak memerlukan pemanasan, pelarut dipilih berdasarkan kepolaran dan kelarutan bahan sehingga pemisahan mudah, dan proses perendaman hanya tinggal memungkinkan ekstraksi banyak senyawa yang terekstraksi (Susanty & Bachmid, 2016). Selain keuntungan yang baik, maserasi memiliki kelemahan yaitu membutuhkan waktu lama, tidak semua senyawa larut pada suhu ruang sehingga perubahan suhu juga diperlukan agar maserasi lebih optimal (Chairunnisa *et al.*, 2019).

2) Perkolasi

Proses ekstraksi di mana pelarut organik dituangkan di atas bahan tanaman dengan pelarut selanjutnya membawa senyawa ini bersamanya adalah proses perkolasi (Hasrianti et al., 2016). Proses perkolasi dilakukan dengan bantuan perkolasi tanaman yang ditempatkan dalam alat perkolasi (perkolator) hingga alirannya mengalir dan ditempatkan di wadah di bawahnya sebagai penampungnya. Perendaman pelarut perkolasi dapat memakan waktu ± 3 jam dan hasil perendaman dilewatkan melalui perkolator selama 2 hari hingga warna aliran tetes jernih (Hasanah et al., 2015). Keuntungan perkolasi adalah pelarut yang masuk ke bahan diencerkan dengan pelarut baru. Namun penggunaan perkolasi membutuhkan banyak pelarut, jika bahan simplisia tidak homogen pelarut sulit mengalir ke semua bagian yang seharusnya mengalir, dan metode perkolasi membutuhkan waktu yang lama (Mukhriani, 2014).

3) Infusa

Metode infus yang sederhana dan murah juga memiliki sedikit kekurangan meliputi hilangnya zat yang mudah menguap melalui penguapan, zat tersebut akan mengendap kembali ketika kelarutannya sangat jenuh dan beberapa orang sederhana tidak dapat menggunakan metode ini. karena zat yang terkandung di dalamnya tidak tahan terhadap pemanasan yang lama (Karim, 2014). Proses kerja infus melibatkan pemanasan bahan yang digunakan cukup dengan pelarut air hingga 90°C dalam 15 menit. Waktu 15 menit dihitung pada saat suhu mencapai 90 °C dengan pengadukan

berulang (Khafidhoh *et al.*, 2015). Simplisia yang sudah matang kemudian disaring dan diuapkan untuk mengurangi pelarut dari infusa (Leonardy *et al.*, 2019).

4) Sokletasi

Metode ekstraksi lainnya adalah soxletasi. Soxletasi adalah proses yang menggunakan pelarut organik yang mengalir berulang kali pada suhu dan jumlah pelarut tertentu. Bahan simplisia yang dibungkus dengan kertas saring diletakkan di atas timbal yang terletak di bawah kondensor, yang juga mengandung pelarut tertentu di dalam timbal (Zain, *et al.*, 2016). Penuangan berulang dengan cara ini dapat dilakukan sampai pelarut tidak lagi menghasilkan warna. Hal ini dapat dilakukan dalam waktu sekitar 2 jam dengan pemanasan pada suhu 70 °C dan memberikan ± 5 siklus ekstraksi hingga warna pelarut memudar (Zain, *et al.*, 2016).

5) Refluks

Prinsip refluks hampir sama dengan soxletasi, namun perbedaannya disini adalah soxleting pelarut yang digunakan pada sampel tertentu, sedangkan pada refluks pelarut dicampur langsung dengan sampel terbatas pada suhu dan waktu tertentu yang relatif untuk memperbaiki adanya air hidup dan mati (*recooling*) (Hasrianti, *et al.*, 2016). Menggunakan suhu sekitar 60 °C pada proses refluks dengan pemanasan selama 3 jam menghasilkan ekstrak cair, yang kemudian dipanaskan kembali dalam penangas air hingga menghasilkan ekstrak kental (Syamsul, *et al.*, 2020). Pada dasarnya, pelarut yang dimasukkan ke dalam tabung alas bulat menguap pada suhu

tinggi tetapi akan didinginkan dan berubah menjadi embun saat melewati kondensor kemudian kembali ke tabung alas bundar, sehingga pelarut yang menguap tidak mengalir keluar selama proses refluks (Susanty & Bachmid, 2016).

2.2.1 Tinjauan tentang ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan cara mengekstraksi zat aktif yang berasal dari nabati atau hewani dengan pelarut yang sesuai, setelah itu semua atau hampir semua pelarutnya diuapkan dan sisa massa atau serbuknya diolah sehingga memenuhi standar yang ditetapkan (Depkes RI, 1995).

Ekstrak cair adalah sediaan simplisia herbal yang mengandung etanol sebagai pelarut atau pengawet. Kecuali dinyatakan lain dalam setiap monografi, setiap mL ekstrak mengandung 1 gram simplisia yang memenuhi syarat. Ekstrak cair yang cenderung mengendap dapat didiamkan dan disaring, atau bagian beningnya dapat dituangkan. Cairan bening yang dihasilkan memenuhi persyaratan farmakope. Ekstrak cair dapat dibuat dari ekstrak yang sesuai (Depkes RI, 1995).

2.3 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor penentu dalam proses ekstraksi, sehingga banyak faktor yang harus diperhatikan dalam pemilihan pelarut. Ada dua pertimbangan utama dalam pemilihan jenis pelarut, yaitu pelarut harus mempunyai daya larut yang tinggi dan pelarut tidak berbahaya atau tidak beracun (Guenther, 2006). Tabel 3 menunjukkan titik didih berbagai pelarut dan

komponen terlarut. Di antara pelarut ini, yang paling umum digunakan adalah air, etanol, etil asetat, petroleum eter, kloroform, dan heksana.

Tabel 2.1 Jenis pelarut dan komponen terlarut serta titik didihnya
Sumber : Schefflan & Morris (1983), Weissenberg (2001).

Jenis Pelarut	Titik Didih (°C)
Air	100
Etanol	78,8
Etil Asetat	77
Petroleum Eter	70
Heksana	69
Asam Askorbat	> 190
Karotenoid	> 580
Alkaloid	> 100
Steroid	> 135

Menurut Sutrian (2008), pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah yang memilikinya kelarutan yang tinggi dari zat yang dapat diekstraksi. Kelarutan yang tinggi ini berkaitan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang dapat diekstraksi. Senyawa polar memiliki kecenderungan kuat untuk larut dalam pelarut polar dan sebaliknya. Berdasarkan tetapan listriknnya, pelarut organik dapat dibedakan menjadi dua, yaitu polar dan non polar. Konstanta dielektrikum dinyatakan sebagai gaya tolak menolak antara dua partikel bermuatan listrik dalam sebuah molekul. Semakin tinggi konstanta dielektrikunya semakin polar pula pelarutnya (Sudarmadji, *et al.*, 1989). Pelarut dapat digunakan untuk ekstraksi tunggal atau campuran. Pelarut campuran yang paling sering digunakan campuran air dan etanol, campuran air dan metanol dan campuran air dan eter.

2.3.1 Kloroform

Kloroform adalah senyawa yang mengandung setidaknya 99,0 % lebih dari 99,5% CHCl_3 dan sisanya adalah alkohol. Kloroform adalah pelarut

dengan sifat semipolar. Ketika kloroform menguap dalam nyala api, maka akan membentuk gas yang berbahaya (Departemen Kesehatan, 2014).

2.3.2 Asam Asetat

Asam asetat atau lebih dikenal dengan asam cuka (CH_3COOH) merupakan senyawa bentuk cair, tidak berwarna, berbau menyengat dengan rasa asam kuat dan larut dalam air, alkohol, gliserol, eter. Pada tekanan atmosfer, titik didihnya adalah $118,1^\circ\text{C}$. Asam asetat memiliki aplikasi yang sangat luas dalam industri dan industri makanan. Di Indonesia kebutuhan asam asetat masih harus diimpor, sehingga kemandirian dalam penyediaan bahan ini harus diupayakan (Handoyo, 2007).

2.3.3 Metanol

Metanol adalah senyawa kimia dengan rumus kimia CH_3OH atau etil etanol adalah zat yang mudah terbakar, sangat ringan, mudah menguap tidak berwarna, memiliki bau yang khas, sedikit lebih manis dan alkohol paling sederhana. Banyak produk industri penggunaan metanol sebagai cairan pembersih mobil, tiner cat, detergen dan parfum. Selain itu, metanol juga digunakan untuk dicampur dengan etanol sebagai minuman keras tradisional (Levine. *et al.*, 2009).

2.3.4 Aseton

Aseton adalah senyawa karbonil dengan gugus fungsi keton ($-\text{CO}$). Aseton juga dikenal sebagai propanon, dimetil keton, propan-2-on, 2-propanon, β -keton propana dan dimetil formal dehidra. Aseton dibuat dari alkohol sekunder dengan cara oksidasi. Aseton adalah senyawa organik

dalam bentuk cairan tidak berwarna dan mudah terbakar. Sifat aseton mudah menguap, mudah terbakar dan memiliki bau yang khas. Aseton biasanya digunakan sebagai pelarut (Prasetyo *et al.*, 2018).

2.3.5 Etanol

Etanol atau sering juga disebut Alkohol adalah cairan bening mudah terbakar, tidak berwarna, mudah terbakar mudah menguap, bercampur dengan air, eter dan kloroform, diperoleh dengan melalui fermentasi karbohidrat dari ragi disebut juga dengan etil alkohol (Mardoni, 2007). Etanol atau etil alkohol (C_2H_5OH) termasuk pemberian gugus hidroksil polaritas dalam molekul dan mengakibatkan meningkatnya ikatan hidrogen intermolekuler. Etanol memiliki kelarutan yang relatif tinggi dan karena itu tidak bereaksi dengan komponen lain. Kerugiannya adalah harganya yang mahal (Mardoni, 2007). Massa jenis etanol adalah 0,7893 g/mL. Titik didih etanol di bawah tekanan suhu atmosfer adalah 78,32 °C. Indeks bias viskositas pada 20°C adalah 1,36143 dan 1,17 cP. Etanol adalah pelarut *volatile* atau semi-polar karena dapat melarutkan senyawa polar dan non polar. Gugus-OH polar dan -CH₃CH₂ non polar. Karbon pendek pada etanol ini menyebabkan sifat non-polar.

2.4 Senyawa Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa yang tersebar luas di sebagian besar tanaman. Semua alkaloid mengandung setidaknya satu atom nitrogen dasar dan membentuk cincin heterosiklik (Harbourne, 1984). Alkaloid dapat ditemukan pada biji, daun, ranting dan kulit kayu. Kandungan alkaloid tanaman ini bisa

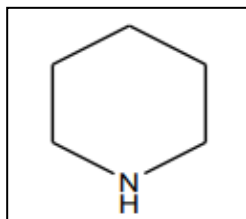
mencapai 10-15%. Alkaloid sebagian besar beracun, tetapi beberapa sangat berguna dalam pengobatan. Alkaloid yang tidak berwarna, biasanya aktif secara optik, sebagian besar merupakan senyawa kristal, tetapi hanya sedikit yang berbentuk cair seperti nikotin pada suhu kamar (Sabirin, *et al.*, 1994). Alkaloid biasanya terdapat pada tanaman dalam bentuk garam organik, padat dan kristal, dan sebagian besar tidak berwarna. Adanya alkaloid pada daun dan buah segar biasanya memberikan rasa pahit di lidah. Dalam bidang kesehatan, alkaloid berperan sebagai pemicu syaraf, penambah tekanan darah, pereda nyeri, antimikroba, obat penenang, obat penyakit jantung dan lain-lain (Robinson, 1995).

Alkaloid juga bisa dalam bentuk cair, seperti nikotin dan konin. Alkaloid umumnya hanya larut dalam pelarut organik. Kebiasaan pada senyawa alkaloid tersebut mudah mengalami dekomposisi, khususnya panas dan cahaya dengan adanya oksigen. Hasil dekomposisi seringkali berupa N-oksida (Lenny, 2006). Alkaloid dapat dibedakan dari sebagian besar komponen tanaman lainnya berdasarkan sifat dasarnya. Oleh karena itu, golongan senyawa ini sering diisolasi dalam bentuk garamnya dengan pelarut HCl atau H₂SO₄ (Kristanti, *et al.*, 2008).

Alkaloid biasanya diperoleh dengan cara mengekstraksi bahan dengan menggunakan air yang sudah diasamkan, pengasaman dilakukan dengan menambahkan HCl. Tujuannya adalah untuk menarik alkaloid dan membentuk garam alkaloid amina serta meningkatkan kelarutan alkaloid dalam air. Alkaloid amina bereaksi dengan asam kuat membentuk garam alkilamonium. Jenis reaksi ini digunakan untuk memisahkan amina dari zat netral atau larut dalam air dalam

suasana asam. Garam alkaloid hasil pengasaman dibuat basa dengan penambahan NH_4OH , sehingga garam alkaloid tersebut membentuk basa bebas alkaloid (Robinson, 1995).

2.4.1 Struktur Alkaloid



Sumber: (Robinson, 1995)

Gambar 2.3 Struktur Senyawa Alkaloid

Sebagian besar alkaloid memiliki kerangka dasar polisiklik dasar yang mengandung cincin heterosiklik nitrogen dan mengandung substituen yang tidak terlalu bervariasi. Atom nitrogen alkaloid hampir selalu dalam bentuk gugus amin ($-\text{NR}_2$) atau gugus amida ($-\text{CO}-\text{NR}_2$) dan tidak pernah dalam bentuk gugus nitro (NO_2) atau gugus diazo. Meskipun substituen oksigen biasanya terdapat sebagai gugus fenol ($-\text{OH}$), metoksi ($-\text{OCH}_3$), atau metilendioksi ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$), substituen oksigen dan gugus N-metil ini merupakan karakteristik dari sebagian besar alkaloid (Lenny, 2006).

2.4.2 Sifat Umum Alkaloid

Alkaloid umumnya terdapat dalam bentuk bebas di alam, memiliki rasa pahit, bersifat basa lemah dan sukar larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik non-polar seperti kloroform dan dietil eter. Beberapa alkaloid memiliki warna yang khas seperti berberin yang berwarna kuning dan garam sanguinarine serta tembaga berwarna merah. Alkaloid adalah senyawa basa karena atom nitrogen memiliki pasangan elektron bebas yang berasal dari

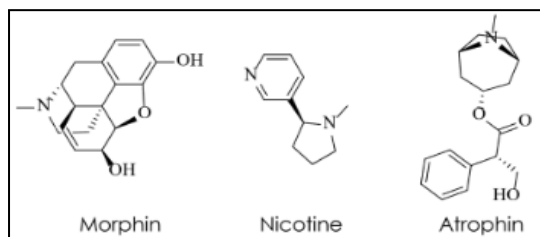
asam amino. Sebagian besar alkaloid mengandung satu inti kerangka piridin, quinolin, dan isquinolin atau tropan yang bertanggung jawab atas efek farmakologis pada manusia. Ketika alkaloid bereaksi dengan senyawa asam mereka membentuk garam kristal tanpa membentuk air, itulah sebabnya garam lebih mudah larut dalam air dari pada senyawa bebasnya (Julianto, 2019).

2.4.3 Klasifikasi Alkaloid

Pada dasarnya alkaloid umumnya diklasifikasikan berdasarkan molekul prekursor atau jalur sintetik dari molekul tersebut. Dari sudut pandang struktural alkaloid dikelompokkan menurut bentuk, struktur, dan prekursor. Golongan ini dibagi menjadi tiga jenis alkaloid, yaitu *true alkaloid*, *protoalkaloid*, dan *pseudoalkaloid* (Ruswanto, *et al.*, 2022).

1) *True Alkaloid*

True alkaloid atau alkaloid sejati mengandung atom nitrogen yang berasal dari turunan asam amino dan terdapat dalam cincin heterosiklik. Alkaloid ini sangat reaktif secara biologis bahkan dalam dosis kecil. Semua alkaloid sejati memiliki rasa pahit dan padatan putih, kecuali nikotin, yang merupakan cairan berwarna coklat. Alkaloid sejati ditemukan di alam ditemukan dalam keadaan bebas, sebagai garam atau dalam bentuk N-oksida (Ruswanto, *et al.*, 2022).
Contoh : *Morphin, Nicotine, Atrophin*.

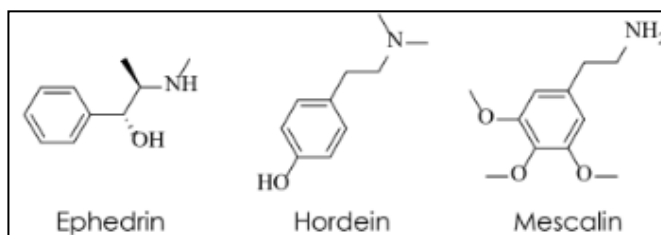


Sumber: (Ruswanto, *et al.*, 2022)

Gambar 2.4 *Morphin, Nicotine, Atrophin.*

2) *Protoalkaloid*

Protoalkaloid adalah alkaloid yang atom nitrogennya berasal dari asam amino, tetapi bukan bagian dari ikatan cincin heterosiklik. *Protoalkaloid* memiliki cincin tertutup dan struktur sederhana. Alkaloid ini adalah minoritas dari semua alkaloid (Ruswanto, *et al.*, 2022). Contoh : *Ephedrine, Hordenine, Mescaline*.

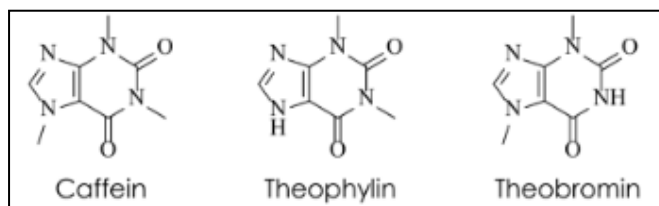


Sumber: (Ruswanto, *et al.*, 2022)

Gambar 2.5 *Ephedrine, Hordenine, Mescaline.*

3) *Pseudoalkaloid*

Tidak seperti alkaloid sejati dan *pseudoalkaloid*, atom nitrogen dalam struktur *pseudoalkaloid* tidak berasal dari asam amino, meskipun sebenarnya *pseudoalkaloid* terkait dengan jalur asam amino karena berasal dari prekursor asam amino. *Pseudoalkaloid* juga diproduksi dalam reaksi aminasi dan transaminasi yang diperoleh dengan asam non-amino (Ruswanto, *et al.*, 2022). Contoh : *Caffeine, Theophyllin, Theobromin*.



Sumber: (Ruswanto, *et al.*, 2022)

Gambar 2.6 *Caffein, Theophylin, Theobromin.*

2.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi juga dikenal sebagai HPLC dikembangkan pada akhir 1960-an dan awal 1970-an. Saat ini, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Metode pemisahan yang banyak digunakan dalam analisis dan pemurnian senyawa dari sampel tertentu termasuk industri farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri makanan (Gandjar & Rohman, 2018).

2.5.1 Pengertian KCKT

Kromatografi adalah teknik di mana zat terlarut atau zat terlarut dipisahkan oleh perbedaan laju elusi ketika zat terlarut tersebut melewati kolom kromatografi. Pemisahan zat terlarut ini ditentukan oleh pembagian zat terlarut menjadi fase gerak dan diam. Penerapan kromatografi cair yang berhasil untuk masalah tertentu memerlukan kombinasi yang tepat dari berbagai kondisi operasional seperti: Jenis kolom, fase gerak, panjang dan diameter kolom, kecepatan aliran fase gerak, suhu kolom, dan ukuran sampel. Untuk memilih kombinasi kondisi kromatografi yang terbaik itu membutuhkan pemahaman dasar tentang berbagai faktor yang mempengaruhi pemisahan dalam kromatografi cair (Gandjar dan Rohman, 2007).

2.5.2 Prinsip Kerja KCKT

Prinsip kerja KCKT/HPLC adalah memisahkan komponen analit yang dianalisa sesuai dengan kepolarannya, detektor mendeteksi setiap campuran

dan mencatatnya dalam bentuk kromatogram. Jumlah puncak menunjukkan banyaknya komponen dan luas puncak menunjukkan konsentrasi komponen dalam campuran (Rohman, 2018).

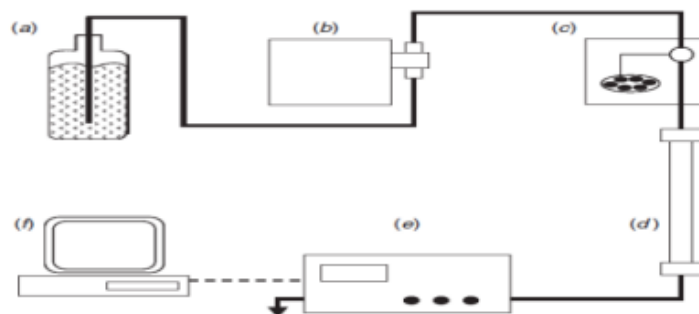
2.5.3 Keuntungan KCKT

Keuntungan KCKT menurut Gandjar dan Rohman, 2007 adalah:

- 1) **Cepat** : Waktu analisis biasanya kurang dari 1 jam.
- 2) **Resolusi** : Berbeda dengan KC, kromatografi cair terdiri dari dua fase dimana interaksi selektif dapat terjadi. Pada KC, gas yang mengalir memiliki sedikit interaksi dengan zat padat, pemisahan terutama dicapai dengan fase diam saja. Kemampuan zat padat untuk berinteraksi secara selektif dengan fase diam dan bergerak dalam KCKT memberikan parameter tambahan yang harus dicapai untuk pemisahan yang diinginkan.
- 3) **Sensitivitas Detektor** : Detektor absorpsi UV yang biasa digunakan dalam KCKT dapat mendeteksi kadar dalam jumlah nanogram (10^{-9} gram) dari bermacam-macam zat. Detektor-detektor Fluoresensi dan Elektrokimia dapat mendeteksi jumlah picogram (10^{-12} gram). Detektor seperti spektrofotometer massa, indeks bias, radiometri, dll juga dapat digunakan dalam KCKT.
- 4) **Kolom yang dapat digunakan kembali** : Banyak analisis dapat dilakukan pada kolom yang sama dengan jenis sampel yang diinjeksi sebelumnya, analisis lebih lanjut sampel dapat langsung dilanjutkan

- tanpa mengubah kolom (perhatikan kemurnian pelarut dan jenis pelarut yang digunakan).
- 5) **Jumlah sampel kecil** : Kuantitas sampel yang digunakan dalam jumlah kecil.
 - 6) **Ideal untuk zat bermolekul besar dan berionik** : Zat yang tidak dapat dianalisis dengan KC karena volatilitasnya yang rendah biasanya diturunkan untuk menganalisis senyawa ionik. KCKT dengan tipe eksklusi dan pertukaran ion sangat ideal untuk menganalisis zat-zat tersebut.
 - 7) **Pengembalian sampel yang mudah** : Pada umumnya detektor yang digunakan pada KCKT tidak menyebabkan kerusakan (destruktif) pada komponen sampel yang akan diperiksa, sehingga komponen sampel tersebut dapat dengan mudah dikumpulkan setelah melewati detektor. Pelarut dapat dihilangkan dengan penguapan kecuali untuk kromatografi penukar ion yang memerlukan prosedur khusus.

2.5.4 Bagian-bagian KCKT



Sumber : (Gandjar & Rohman, 2018)

Gambar 2.7 Diagram sistem KCKT

Instrumen KCKT pada dasarnya terdiri dari beberapa komponen utama, antara lain:

1) Wadah fase gerak

Wadah yang digunakan harus bersih dan inert untuk menampung fase gerak. Wadah pelarut kosong atau labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Wadah penampung biasanya menampung sekitar 1 sampai 2 liter pelarut fase gerak.

2) Pompa

Pompa yang cocok untuk penggunaan KCKT adalah pompa yang memiliki kondisi yang sama dengan wadah larutan, yaitu pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang biasa digunakan sebagai pompa sejenis gelas, baja yang tahan karat, teflon dan batu nilam. Pompa yang digunakan juga harus mampu menghasilkan tekanan hingga 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan laju alir 3 mL/menit. Pompa yang digunakan untuk sediaan harus mampu memompa fase gerak dengan kecepatan 20 ml/menit.

3) Tempat Injeksi Sampel

Sampel cair dan larutan diinjeksikan langsung ke fase gerak yang mengalir ke kolom di bawah tekanan melalui injektor bahan tembaga yang tahan karat dan tutup teflon yang dilengkapi dengan sampel loop internal atau eksternal.

4) Kolom

Ada 2 jenis kolom pada KCKT yaitu kolom microbor dan kolom konvensional. Kolom adalah bagian KCKT yang memiliki fase diam sebagai tempat terjadinya proses pemisahan zat terlarut dan analit. Kolom mikrobor memiliki 3 keuntungan utama dibandingkan kolom konvensional, yaitu:

- a) Pemanfaatan fase gerak dalam kolom mikrobor hanya sekitar 80% atau kurang dibandingkan dengan kolom konvensional karena laju alir fase gerak lebih lambat di kolom mikrobor (10.100 $\mu\text{L}/\text{min}$).
- b) Aliran fase gerak tidak terlalu cepat, yang membuat kolom mikrobor lebih akurat jika dikombinasikan dengan spektrofotometri massa.
- c) Sensitivitas kolom mikrobor meningkat ketika zat terlarut lebih pekat, sehingga kolom jenis ini sangat berguna ketika jumlah sampel terbatas misal sampel klinis.

5) Detektor

Detektor KCKT dibagi menjadi dua kelompok, yaitu detektor universal dan detektor spesifik. Idealnya, detektor harus memiliki karakteristik sebagai berikut:

- a) Menanggapi zat terlarut dengan cepat dan berulang.
- b) Memiliki sensitivitas yang baik dan mampu mendeteksi zat terlarut dalam jumlah yang sangat kecil.

- c) Stabil dalam digunakan.
 - d) Volumanya kecil untuk mengurangi penyebaran pita
 - e) Sinyal yang dihasilkan berada dalam rentang yang luas (rentang linier) dan sebanding dengan konsentrasi zat terlarut.
 - f) Tidak berpengaruh pada temperatur serta kecepatan alir fase gerak
- 6) Komputer, Integrator, atau Rekorder

Perangkat akuisisi data seperti komputer, integrator atau rekorder terhubung ke detektor. Alat ini mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor kemudian merekamnya sebagai kromatogram, yang selanjutnya dapat dievaluasi oleh analis (Gandjar & Rohman, 2018).

2.5.5 Jenis-jenis KCKT

Klasifikasi kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) berdasarkan pada sifat fase diam yaitu :

1) Kromatografi Adsorpsi

Dalam pemisahan dengan kromatografi adsorpsi gel silika atau alumina digunakan sebagai fase diam. Fase gerak berupa pelarut non-polar yang ditambahkan ke pelarut polar seperti air atau alkohol rantai pendek untuk meningkatkan kemampuan elusinya untuk menghindari pengekoran puncak, seperti n-heksana ditambah metanol. Jenis KCKT ini cocok untuk pemisahan campuran isomer

struktural dan pemisahan zat terlarut yang mengandung gugus fungsional yang berbeda (Gandjar dan Rohman, 2007).

2) Kromatografi Partisi

Jenis kromatografi ini juga dikenal sebagai kromatografi. Dalam kromatografi ini, sebagian besar fase diam terdiri dari silika yang dimodifikasi secara kimiawi atau terikat. Hingga saat ini, hidrokarbon non-polar seperti oktadeksilsilana, oktasilana atau fenil telah digunakan untuk memodifikasi silika. Fase diam yang paling populer adalah oktadesilsilan (ODS atau C_{18}) umumnya digunakan dan sebagian besar pemisahan fase terbalik. Sedangkan fase gerak merupakan campuran asetonitril atau metanol dengan air atau larutan buffer (Rohman, 2009).

Ditinjau dari jenis fase diam dan fase gerak, kemudian kromatografi bagian-bagian tersebut dapat dibedakan sebagai berikut:

a) Kromatografi Fase Normal

Kromatografi Fase Normal (fase diam lebih polar dari pada fase gerak), kapasitas elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Fase gerak biasanya non-polar. Dietil eter, benzena, hidrokarbon lurus seperti pentana, heksana, heptana atau iso-oktana sering digunakan. Halida alifatik seperti diklorometana, diklormetana, butilklorida dan kloroform juga digunakan. Gas terlarut umumnya tidak menyebabkan masalah pada fase normal (Gandjar dan Rohman, 2007).

b) Kromatografi Fase Terbalik

Kromatografi Fase Terbalik (fase diam kurang polar dari pada fase gerak), Kapasitas elusi menurun dengan meningkatnya polaritas larutan. Pada fase terbalik, kandungan utama adalah air. Pelarut yang larut dengan air seperti metanol, etanol, asetonitril, dioksan, tetrahidrofur dan dimetilformamida ditambahkan untuk mengatur kepolaritas fase gerak. Asam, basa dan buffer juga dapat ditambahkan surfaktan jadi mutu air harus tinggi baik air destilasi maupun air mineral (Gandjar dan Rahman, 2007).

3) Kromatografi Pertukaran

Kromatografi cair kinerja tinggi pertukaran ion menggunakan fase diam yang dapat bertukar kation atau anion dengan fase gerak. Namun, ada banyak penukar ion di pasaran yang paling umum adalah resin polistiren (Gandjar dan Rohman, 2007). Teknik ini mengandalkan pertukaran ion (adsorpsi) antara fase gerak dan tempat-tempat berion dari kemasan. Sebagian besar resin berasal dari polimer divinylbenzene-styrene dengan gugus fungsi tambahan. Resin jenis amina kuartener dan asam sulfonat adalah pilihan yang baik untuk resin dan digunakan secara luas. Keduanya, fase terikat dan resin telah digunakan. Teknik ini banyak digunakan dalam ilmu kehidupan dan khususnya dikenal untuk pemisahan asam amino. Teknik ini bisa digunakan untuk keduanya kation-kation dan anion-anion (Gandjar dan Rohman, 2007).

4) Kromatografi Eksklusi Ukuran

Kromatografi ini juga disebut sebagai kromatografi filtrasi gel (filtrasi) dan digunakan untuk memisahkan atau menganalisis senyawa dengan berat molekul lebih besar dari 2000 Dalton. Fase diam yang digunakan dapat berupa silika atau polimer yang bersifat porus untuk memungkinkan zat terlarut melewati porus atau berdifusi melalui fase diam (Gandjar dan Rohman, 2007).

2.6 Validasi Metode Analisis

Metode yang digunakan dalam laboratorium kimia analitik harus dievaluasi dan diuji untuk memastikan bahwa metode tersebut dapat memberikan data yang valid dan sesuai dengan tujuan, maka metode tersebut harus divalidasi (Riyanto, 2015). Validasi metode analisis adalah evaluasi terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk menunjukkan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk digunakan (Harmita, 2004).

Sebuah metode analitik harus divalidasi untuk memastikan bahwa parameter kinerjanya cukup memadai untuk menyelesaikan masalah analitik, oleh karena itu metode tersebut harus divalidasi ketika :

- 1) Metode baru dikembangkan untuk memecahkan masalah analitis tertentu
- 2) Metode standar direvisi agar sesuai karena perkembangan atau terjadinya suatu masalah menginstruksikan untuk memeriksa metode default
- 3) Jaminan kualitas menunjukkan bahwa metode standar adalah telah berubah dari waktu ke waktu

- 4) Metode standar digunakan di laboratorium yang berbeda, dilakukan oleh analis yang berbeda atau dengan peralatan yang berbeda.
- 5) Menunjukkan persamaan antara dua metode, misalnya antara metode baru dan metode standar. (Gandjar dan Rohman, 2012).

Semua metode analisis harus dicirikan dengan baik, divalidasi secara lengkap dan didokumentasikan. Metode analisis harus memenuhi persyaratan yang ditentukan untuk selektivitas, akurasi, batas deteksi, linearitas, dan presisi. Pengetahuan tentang stabilitas zat aktif dan/atau hasil biotransformasi bahan sampel merupakan prasyarat untuk mendapatkan hasil yang dapat dipercaya. Harus diperhatikan bahwa (WHO, 2006):

- 1) Validasi dilakukan sebelum pengujian dan selama fase pengujian
- 2) Validasi harus mencakup tujuan penetapan ditargetkan
- 3) Rentang kalibrasi harus sesuai dengan sampel
- 4) Jika penetapan kadar digunakan di beberapa bagian yang berbeda, penetapan kadar harus divalidasi di setiap bagian dan atur indeks perbandingan silang dari bagian-bagian tersebut
- 5) Metode analisis tidak rutin digunakan membutuhkan revalidasi yang cukup untuk memastikan hal ini prosedurnya mengikuti prosedur aslinya dikonfirmasi; studi validasi biasanya harus didokumentasikan laporan percobaan terlampir.
- 6) Penggunaan dua atau lebih metode dalam studi tertentu Indikasi penetapan kadar sampel di area matriks yang sama kalibrasi yang sama tidak dianjurkan.

- 7) Jika perlu membandingkan penentuan yang berbeda (sampel dari pengujian ini dianalisis dengan metode yang berbeda dan metode tersebut mencakup konsentrasi dan matriks yang sama), pengujian harus divalidasi ulang.

Sebelum melakukan analisis, analis harus memastikan bahwa sistem dan prosedur yang digunakan mampu menghasilkan data yang dapat diterima. Hal ini dapat dilakukan melalui uji kesesuaian sistem, yang didefinisikan sebagai serangkaian pengujian untuk memastikan bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Persyaratan kesesuaian sistem biasanya dibuat setelah pengembangan dan validasi metode (Gandjar dan Rohman, 2012).

United States Pharmacopoeia (USP) mendefinisikan parameter yang dapat digunakan untuk menentukan kesesuaian sistem sebelum analisis. Parameter yang digunakan antara lain: lempeng teori (N), faktor tailing, kapasitas (k' atau α) dan nilai standar deviasi relatif (RSD) tinggi atau luas puncak dari 5 kali injeksi larutan standar pada prinsipnya dapat diterima sebagai kriteria standar ketika menguji komponen sebanyak itu (komponen mayor) bila nilai $RSD \leq 1\%$ untuk 5 kali injeksi. Namun, untuk senyawa dengan konsentrasi jejak, nilai RSD dapat diterima jika 5-15% (Gandjar dan Rohman, 2012).

2.6.1 Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan untuk secara akurat dan spesifik mengukur analit target dengan adanya komponen matriks sampel lainnya, seperti ketidakmurnian, produk degradasi dan komponen matriks (Gandjar

dan Rohman, 2012). Selektivitas seringkali dapat dinyatakan dalam bentuk derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan tambah berupa pengotor, hasil degradasi, senyawa terkait, senyawa asing lainnya dan dibandingkan dengan hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan tambah lain (Harmita, 2004).

Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung polutan, produk degradasi, senyawa serupa, zat eksternal lain atau plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa zat tersebut. penyimpangan hasil bila ada perbedaan antara hasil uji keduanya (Harmita, 2004).

2.6.2 Linieritas

Linearitas biasanya dinyatakan sebagai variansi terhadap arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematis dari data yang diperoleh dari hasil percobaan analit pada sampel dengan konsentrasi analit yang berbeda. Pengolahan matematis dalam pemeriksaan linieritas dilakukan dengan persamaan langsung antara hasil analisis konsentrasi, yang dilakukan dengan menggunakan metode kuadrat terkecil. Dalam beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analisis, data yang diperoleh diolah dengan transformasi matematis sebelum dilakukan analisis regresi (Harmita, 2004).

Dalam praktiknya, beberapa solusi berbeda digunakan konsentrasinya adalah 50-150% analit dalam sampel. Dalam literatur sering disebutkan bahwa rentang konsentrasi yang digunakan adalah 0-200%. Jumlah sampel

yang dianalisis minimal delapan blanko (Harmita, 2004). Penentuan linearitas bisa terjadi menurut rumus berikut:

$$s_y = \frac{\sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}}{n - 2}$$

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b}$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{x} \times 100\%$$

2.6.3 Batas Deteksi (LOD)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi tetapi tidak ditentukan secara tepat. LOD adalah batas uji yang secara khusus menunjukkan apakah suatu analit berada di atas atau di bawah nilai tertentu (Gandjar, et al., 2007). LOD dapat dihitung menggunakan rumus $LOD = 3 \frac{SD}{S}$, dimana SD didasarkan pada standar deviasi, S adalah *Slope* kurva baku.

Menurut Harmita, metode yang digunakan untuk menentukan batas deteksi metode berbeda-beda tergantung apakah metode analisis tersebut menggunakan instrumen atau tidak. Untuk analisis non-instrumen batas ditetapkan dengan mendeteksi analit dalam sampel menggunakan pengenceran bertingkat. Dalam analisis instrumen, batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respons blanko beberapa kali dan kemudian menghitung standar deviasi dari blanko, dan rumus dapat digunakan dalam perhitungan.

2.6.4 Batas Kuantifikasi (LOQ)

Menurut Konvensi Farmakope Amerika Serikat (2007), batas kuantifikasi adalah penentu kuantitatif pada batas bawah suatu senyawa dalam matriks sampel, seperti batas kuantifikasi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan akurasi yang wajar di bawah kondisi percobaan tertentu. Batas kuantifikasi dinyatakan sebagai konsentrasi (misalnya persentase, ppm, bpm) analit dalam sampel.

Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan akurasi dan presisi yang wajar di bawah kondisi pengoperasian metode yang digunakan (Gandjar, et al., 2007). Ini dihitung menggunakan rumus $LOQ = 10 \frac{SD}{S}$, di mana SD didasarkan pada standar deviasi, S yang merupakan *Slope* kurva baku.

2.6.5 Akurasi

Akurasi adalah kedekatan nilai terukur (*measured value*) dengan nilai sebenarnya yang diterima (*accepted true value*), dan nilai yang diubah, nilai sebenarnya, dan nilai referensi. Akurasi diukur sebagai jumlah analit yang diperoleh dengan menekan sampel dalam pengukuran. Ada tiga pendekatan yang umum digunakan untuk pengujian akurasi yaitu:

- 1) Menggunakan *SRM* (*Standard Reference Material*)
- 2) Menambahkan *spiking* terhadap plasebo, dan
- 3) Menggunakan metode penambahan standar (Rohman, 2014).

Dalam mendokumentasikan akurasi (*International Conference on Harmonization, ICH*) merekomendasikan pengumpulan data dari 9 kali

pengujian pada 3 konsentrasi berbeda (misalnya 3 konsentrasi dengan 3 replikasi) (Gandjar dan Rohman, 2012). Data akurasi harus dinyatakan sebagai persentase pemulihan, kisaran kriteria penerimaan yang direkomendasikan yang digunakan untuk menilai akurasi selama validasi metode analitik (Latimer, 2016).

2.6.6 Presisi

Presisi adalah ukuran tingkat kesesuaian antara hasil tes individu, diukur sebagai dispersi hasil individu dari rata-rata ketika metode diterapkan berulang kali pada sampel yang diambil dari campuran homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat didefinisikan sebagai keterulangan (*repeatability*) yaitu keakuratan suatu metode ketika dilakukan beberapa kali dalam kondisi yang sama dan dalam interval waktu yang pendek dan sebagai ketertiruan (*reproducibility*) yaitu mengungkapkan keakuratan metode ketika dilakukan dalam kondisi yang berbeda, seperti menggunakan analisis, peralatan dan laboratorium yang berbeda (Harmita, 2014).

Presisi adalah keterulangan metode analisis dan biasanya dinyatakan sebagai simpangan baku relatif (*Relative Standard Deviation, RSD*). Nilai *RSD* juga biasa disebut sebagai koefisien variasi (KV) berdasarkan beberapa pengukuran sampel (Rohman, 2004). Kriteria yang cermat ditunjukkan ketika metode tersebut menghasilkan simpangan baku relatif atau koefisien variasi sebesar 2% atau kurang (Harmita, 2014). Namun, kriteria ini sangat fleksibel bergantung pada kondisi analit yang dianalisis, jumlah sampel dan kondisi

laboratorium. Simpangan baku relatif (*Relative Standard Deviation, RSD*) yang diijinkan untuk setiap konsentrasi analit dalam sampel (Latimer, 2016).

2.6.7 Uji Kesesuaian Sistem

Untuk menentukan ini, uji kesesuaian sistem (USS) harus menentukan keefektifan sistem operasi (Ditjen POM, 1995). Sistem dianggap layak jika memenuhi persyaratan waktu retensi, faktor kapasitas, efisiensi kolom, resolusi dan faktor ikutan.

1) Waktu Retensi

Waktu retensi adalah waktu yang diperlukan setelah penyuntikan sampel untuk memunculkan puncak analit dari detektor. Puncak kecil di sebelah kiri merupakan puncak spesi sebagai waktu mati (*dead time*). Laju migrasi spesi tidak berubah dengan kecepatan migrasi rata-rata molekul fase gerak dalam kolom.

2) Faktor Kapasitas

Faktor kapasitas merupakan parameter penting yang digunakan menjelaskan laju migrasi analit dalam kolom. Nilai k' 2-8 berarti terjadi pemisahan yang baik

3) Efisiensi Kolom

Ukuran efisiensi kolom adalah jumlah lempeng (*plate number, N*) yang berdasarkan konsep lempeng dasar teoretis pada distilasi. Nilai yang baik $N > 2500$

N dipengaruhi oleh:

- a) Lebar pita (W). Semakin kecil W, semakin besar N, karena itu N menjadi ukuran kolom tersebut baik/tidak nya
- b) Ukuran butir
- c) Distribusi ukuran partikel
- d) Sifat butiran (porous penuh/pelikuler)

4) Resolusi (Daya pisah)

Resolusi didefinisikan sebagai perbedaan antara dua waktu retensi puncak tetangga. Nilai resolusi harus mendekati atau lebih dari 1,5 karena memberikan pemisahan puncak yang baik (*base line resolution*).

Rumus:

$$Rs = \frac{2\Delta t_R}{(W_1 + W_2)}$$

Keterangan :

t_R = waktu retensi (menit)

W = lebar puncak

Ada tiga langkah untuk mencapai resolusi tinggi :

- Harga faktor kapasitas (k'), 1-5 dengan eluen yang sesuai
- Nilai faktor selektivitas (α) dengan eluen lain kecuali kekuatan elusi eluen yang sama/ketiga sebagai aditif (pertukaran buffer, penambahan garam, pasangan ion).
- Harga N >> mengurangi laju aliran efluen sebesar kolom yang lebih panjang menggunakan elemen kolom yang lebih kecil.

5) Faktor Ikutan

Faktor ikutan adalah harga yang dapat menunjukkan terjadinya hal berikut pada kromatogram sehingga bentuk kromatogram berubah tidak simetris.

Alasan *Tailing factor* :

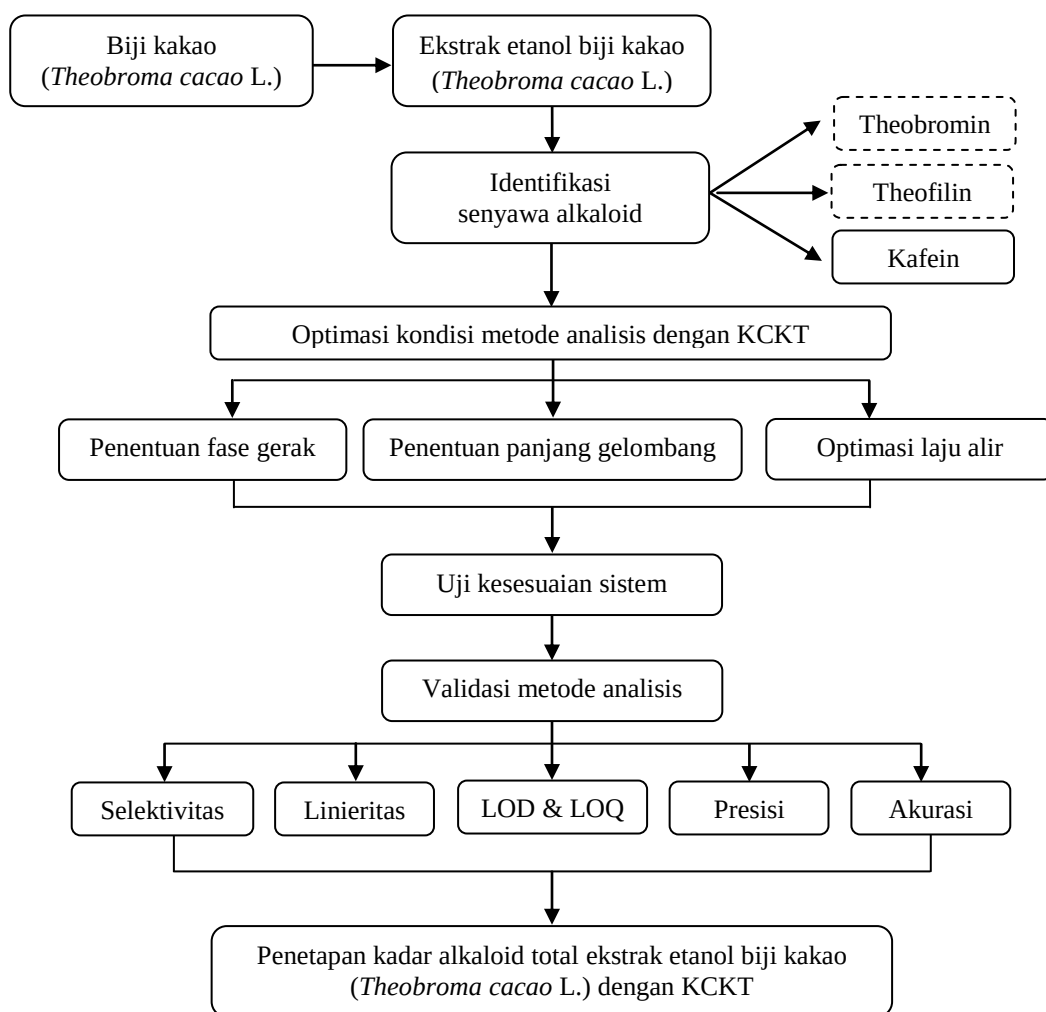
- Guard coloum yang sudah mulai rusak.
- Fase gerak mulai terdekomposisi.
- Partikel silika yang digunakan dalam bahan pembawa tidak partikel silika yang baik.
- Ada bagian lain yang langsung muncul setelah peak. (Ramadhani, 2015).

2.7 Penetapan Kadar Alkaloid Total

Penetapan kadar merupakan zat aktif dalam obat dan/atau makanan dan minuman merupakan bagian dari pengawasan mutu untuk menjamin keamanan obat dan/atau bahan obat. Pada saat yang sama, pemeriksaan konsentrasi suatu senyawa atau bahan aktif adalah salah satu persyaratan terpenting yang harus dipenuhi untuk memastikan kualitas produk atau obat, dan diperlukan metode yang telah divalidasi sebelumnya untuk menentukan konsentrasi (Patil, 2012). Penetapan kadar alkaloid total dalam ekstrak etanol biji kakao dilakukan menggunakan metode KCKT fase terbalik. Sistem KCKT dipilih karena daya pisah yang baik, peka, kolom dapat dipakai berulang, dan dapat digunakan untuk menganalisis molekul besar dan kecil (Harmita, 2015).

BAB 3 KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan :

 = diteliti

 = tidak diteliti

Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

3.2 Hipotesis

Hipotesis menentukan apakah ada hubungan atau pengaruh antara variabel *independent* dan variabel *dependent*. Hipotesis adalah tanggapan sementara terhadap rumusan masalah penelitian, dimana rumusan masalah penelitian disajikan sebagai pertanyaan (Sugiyono, 2017). Hipotesis dari penelitian ini yaitu optimasi validasi metode analisis pada penetapan kadar alkaloid total ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat memenuhi persyaratan parameter validasi metode analisis yaitu selektivitas, linieritas, *limit of detection* (LOD), *limit of quantitation* (LOQ), presisi dan akurasi.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian adalah metode perolehan data secara ilmiah yang memiliki tujuan dan kegunaan tertentu. Penelitian ini menggunakan desain penelitian kuantitatif (Sugiyono, 2017). Penelitian kuantitatif adalah metode penelitian berdasarkan filsafat yang digunakan untuk mempelajari populasi atau sampel tertentu, pengumpulan data menggunakan alat penelitian, dan analisis data bertujuan untuk menguji hipotesis yang telah ditetapkan bersifat kuantitatif atau statistik (Sugiyono, 2017). Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif eksperimental laboratorium dalam uji validasi metode analisis KCKT fase terbalik dan penetapan kadar alkaloid total dari ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri dari objek atau subjek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditentukan melalui penelitian yang diteliti dan kesimpulan yang ditarik (Sugiyono, 2017). Populasi pada penelitian ini adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang didapat dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao yang berada di Kecamatan Jenggawah Kabupaten Jember.

4.2.2 Sampel

Sampel merupakan bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi (Sugiyono, 2017). Sampel pada penelitian ini adalah biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang didapat dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao yang berada di Kecamatan Jenggawah Kabupaten Jember.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas (*Independent*)

Variabel bebas adalah merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (terikat) (Sugiyono, 2017). Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dan optimasi kondisi analisis KCKT fase terbalik.

4.3.2 Variabel terikat (*Dependent*)

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas (Sugiyono, 2017). Variabel terikat pada penelitian ini adalah parameter validasi metode analisis dan kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

4.4 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas dr. Soebandi.

4.5 Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini dimulai bulan Maret hingga Mei 2023.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah petunjuk tentang apa yang harus diamati dan diukur untuk menguji integritas. Definisi operasional menemukan unsur-unsur yang dituangkan dalam instrumen penelitian (Sugiyono, 2017).

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel Bebas (<i>Independent</i>)					
Ekstrak Etanol Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Hasil ekstraksi biji kakao dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%	Timbangan analitik	Menghitung % rendemen hasil ekstrak	Satuan hasil berupa %	Rasio
Optimasi Kondisi Analisis KCKT fase terbalik	Penentuan kondisi optimasi KCKT fase terbalik dilakukan jika memenuhi persyaratan validasi untuk melakukan penetapan kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	KCKT	1) Penentuan laju alir dengan 1,0; 1,2; 1,4 mL/menit 2) Penentuan fase gerak dengan pelarut metanol : <i>aquabidestilata</i> (30:70). 3) Penentuan panjang gelombang 200-800 nm dengan instrument KCKT.	1) Satuan hasil dalam mL/menit 2) Satuan hasil berupa perbandingan komposisi dan volume (mL) 3) Satuan hasil dalam nm	Rasio
Variabel Terikat (<i>Dependent</i>)					
Parameter Validasi Metode Analisis	Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter untuk pembuktian bahwa suatu parameter tersebut memenuhi syarat penerimaannya.	KCKT	1) Selektivitas : membandingkan spectra sampel dan standar 2) Linieritas : menghitung nilai r 3) Akurasi : menghitung % <i>recovery</i> 4) Presisi : menghitung nilai % KV 5) LOD & LOQ : menghitung uji batas terkecil dan konsentrasi terendah dari analit	1) Dinyatakan dalam satuan Rs 2) Dinyatakan dalam nilai r 3) Dinyatakan dalam % <i>recovery</i> 4) Dinyatakan dalam % RSD 5) Dinyatakan dalam satuan ppm	Rasio

Penetapan Kadar Alkaloid Total	kadar merupakan penetapan jumlah kandungan total senyawa alkaloid yang terdapat dalam ekstrak etanol biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	KCKT	Menghitung kadar (x) dari hasil persamaan regresi	% kadar alkaloid total	Rasio
--------------------------------	--	------	---	------------------------	-------

4.7 Teknik Pengumpulan Data

4.7.1 Determinasi Tanaman

Determinasi sampel biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dilakukan di Politeknik Negeri Jember. Penetapan ini bertujuan untuk memperoleh identitas yang benar dan jelas dari tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan penelitian utama (Diniatik, 2015).

4.7.2 Ekstraksi Maserasi

Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi maserasi. Sampel biji kakao ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan ke dalam maserator diikuti dengan penambahan 2,5 liter pelarut etanol 96%. Kemudian sampel yang sudah terendam ditutup rapat. Sampel biji kakao dimaserasi selama 5 hari dan diaduk setiap 24 jam sekali agar proses ekstraksi berjalan maksimal. Setelah 5 hari sampel biji kakao disaring dengan menggunakan corong *Buchner*. Filtrat yang didapat kemudian dipekatkan dengan *waterbath*, dan hasil residu yang didapat diremaserasi kembali dengan pelarut yang baru dilakukan selama 24 jam. Filtrat hasil remaserasi dipekatkan kembali sama seperti maserasi. Ekstrak kental yang dihasilkan dimasukkan ke dalam vial (Wardani, 2021).

4.7.3 Identifikasi Senyawa Alkaloid

Uji alkaloid dapat dilakukan dengan menggunakan tiga pereaksi yaitu *Mayer*, *Dragendorff* dan *Bouchardat*.

1) Uji *Mayer*

Pengambilan sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 2 tetes pereaksi *mayer*. Hasil positif senyawa alkaloid pada pereaksi *mayer* ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kekuningan (Sulistyarini, *et al.*, 2019).

2) Uji *Dragendorff*

Pengambilan sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 2 tetes pereaksi *dragendorff* (Sulistyarini, *et al.*, 2019). Senyawa alkaloid menunjukkan terbentuknya endapan merah bata pada pereaksi *dragendorff* (Septiana *et al.*, 2005). Sedangkan menurut (Sangi, *et al.*, 2008), jika senyawa mengandung alkaloid maka diuji dengan pereaksi *dragendorff* membentuk endapan berwarna jingga-coklat, atau jingga karena senyawa alkaloid berinteraksi dengan ion tetraiodobismutat (III).

3) Uji *Bouchardat*

Pengambilan sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 2 tetes pereaksi *bouchardat* (Sulistyarini, *et al.*, 2019). Hasil positif pada uji *bouchardat* ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna coklat. Endapan yang terbentuk

karena adanya ikatan kovalen koordinat antara ion logam K^+ dengan alkaloid membentuk endapan kompleks alkaloid kalium (Nafisah, *et al.*, 2014). Reagen *Bauchardat* mengandung kalium klorida dan yodium (Sulistyarini, *et al.*, 2019).

4.7.4 Partisi Cair-Cair

Partisi cair-cair dilakukan dengan menggunakan pelarut kloroform. Ekstrak kental biji kakao yang didapatkan ditambahkan dengan 1,5 gram kalsium karbonat ($CaCO_3$) dan ditambah 25 mL pelarut kloroform kedalam corong pisah yang sudah berisi filtrat biji kakao. Melarutkan campuran tersebut sehingga membentuk 2 lapisan. Penambahan 25 mL kloroform diulang sebanyak 3 kali. Ekstraksi ini direplikasi sebanyak 3 kali (Wardani and Fernanda, 2016). Lapisan fase kloroform dapat dipisahkan dan kemudian ditampung lalu diuapkan dalam lemari asam hingga mendapatkan ekstrak kering berbentuk kristal (Sanjaya, *et al.*, 2020).

4.7.5 Pembuatan fase gerak

Fase gerak yang digunakan terdiri dari metanol dan *aquabidestilata*. Pencampuran kedua larutan menggunakan perbandingan metanol : *aquabidestilata* yaitu 30:70. Kemudian larutan disaring dengan *whatman* 0,45 μm dan diawaudarakan menggunakan ultrasonikator selama 5 menit (Clara Maria, 2018).

4.7.6 Pembuatan Pelarut

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah campuran metanol : *aquabidestilata* dengan perbandingan 30:70. Larutan kemudian disaring

dengan penyaring *whatman* 0,45 μm pada corong *buchner* yang dibantu dengan pompa vakum kemudian diawaudarakan menggunakan ultrasonikator selama 5 menit (Clara Maria, 2018).

4.7.7 Pembuatan Larutan Baku Kafein

Sebanyak 25 mg baku kafein ditimbang dan dilarutkan dengan pelarut dalam labu takar 50 mL, sehingga didapatkan larutan stok kafein dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ (Denis Yulius, 2018).

4.7.8 Optimasi KCKT

1) Optimasi Laju Alir

Pemilihan laju alir 1,0; 1,2; 1,4 per menit pada pemisahan analit telah dipelajari. Menurut Rahim, dkk (2014), tercatat bahwa waktu retensi menurun dengan meningkatnya laju aliran dan puncak yang dihasilkan baik.

2) Penentuan Fase Gerak

Optimasi fase gerak dilakukan untuk mendapatkan perbandingan kromatogram terbaik dengan menggunakan variasi fase gerak metanol:*aquabidestilata* yaitu (30:70), metanol:*aquabidestilata* yaitu (30:70), asetronitril:metanol:*aquabidestilata* (80:5:15) (Dyah, 2021)

3) Penentuan Panjang Gelombang

Pada penentuan panjang gelombang maksimum kafein dilakukan pada konsentrasi 100, 300 dan 500 $\mu\text{g/mL}$ yang diperoleh dari larutan intermediet kafein 1000 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian masing-masing larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 200-800 nm

menggunakan *Photodiode Array Detector* (PDA). Panjang gelombang maksimum pengamatan ditentukan berdasarkan detektor dengan serapan yang maksimal (Denis Yulius, 2018).

4.7.9 Uji Kesesuaian Sistem

Uji Kesesuaian Sistem (UKS) terhadap instrumen KCKT dapat dilakukan sebelum validasi metode. UKS dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar satu konsentrasi ke dalam sistem KCKT pada kondisi tertentu. Injeksi diulang (replikasi) 5-6 kali. Parameter yang diukur dalam UKS ini adalah *repeatabilitas*, waktu retensi dan luas permukaan kafein standar. Nilai yang dapat diterima diperkirakan berdasarkan hasil dari parameter ini. Puncak analit harus menunjukkan hasil resolusi yang baik. Syarat penerimaan RSD <2% (Yuwono and Indrayanto, 2005).

4.7.10 Validasi metode analisis

1) Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan dengan memipet sejumlah tertentu sampel kemudian melarutkannya dalam pelarut hingga diperoleh konsentrasi kafein sesuai dengan hasil optimasi konsentrasi percobaan. Larutan yang disiapkan disaring dengan membran filter *whatman* 0,22 μm dan kemudian diinjeksikan ke dalam instrumen KCKT menggunakan metode yang dipilih. Resolusi (R_s) mengacu pada pemisahan dua senyawa yang berdekatan atau puncak dalam kromatogram. Dikatakan selektif jika nilai $R_s > 1,5$ (Yuwono and Indrayanto, 2005).

2) Linieritas

Data linearitas diperoleh dengan membuat 7 titik konsentrasi dari larutan standar kafein dengan rentang konsentrasi 50-120% dari konsentrasi sampel. Larutan standar kafein kemudian disaring dan disuntikkan ke dalam sistem KCKT. Nilai AUC untuk setiap deret konsentrasi diperoleh dari kromatogram. Nilai AUC kemudian diplot terhadap setiap seri konsentrasi baku kafein standar untuk menghitung persamaan garis regresi $y = bx + a$ dan nilai r (Febri Annuryanti, dkk., 2018).

3) Limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ)

Limit deteksi dan limit kuantitasi diperoleh dari 8 titik seri konsentrasi terkecil dari larutan standar kafein yang nilainya masih dapat memberikan respon ketika diinjeksikan pada kondisi KCKT terpilih. Nilai LOD dan LOQ dihitung berdasarkan data simpangan baku dan slope (Febri Annuryanti, dkk., 2018).

4) Presisi

Larutan standar kafein dengan seri konsentrasi antara 50% - 120% dari konsentrasi uji dibuat dalam 6 macam konsentrasi pelarut yang berbeda. Kemudian injeksikan larutan standar baku kafein ke dalam sistem KCKT terpilih sebanyak 6 kali pengulangan, lalu hitung nilai Koefisien Korelasinya (KV), harus kurang dari 2% (Febri Annuryanti, dkk., 2018).

5) Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku standar atau dengan cara adisi standar. Sampel adisi yang telah dipreparasi dengan konsentrasi 100 ppm pada sampel biji kakao dan ditambah dengan larutan standar kafein untuk mencapai konsentrasi 30%, 45% dan 60%. Setiap sampel adisi direplikasi sebanyak 3 kali. Sampel uji akurasi kemudian disaring dan disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi yang dipilih. Perhitungan nilai parameter akurasi dari data *scanning* dengan cara membandingkan hasil kadar sampel dengan kadar standar analit di setiap seri konsentrasi dan mencocokkan hasilnya dengan persyaratan nilai akurasi. Data yang dihasilkan diolah untuk mendapatkan nilai % perolehan kembali (Febri Annuryanti, dkk., 2018).

4.8 Penetapan Kadar Alkaloid Total

Ekstrak kental biji kakao ditimbang sebanyak 5 gram dan ditambahkan 1,5 gram CaCO_3 dan ekstrak biji kakao ditempatkan dalam corong pisah kemudian diekstraksi sebanyak 4 kali dengan menambahkan 25 mL kloroform. Lapisan paling bawah diambil, kemudian ekstrak (fase kloroform) diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai kloroform benar-benar menguap. Ekstrak bebas pelarut dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas dengan *aquadestilata* dan dihomogenkan. Konsentrasi larutan kemudian ditentukan dengan menggunakan instrumen KCKT (Susanti, *et al.*, 2020). Kadar alkaloid total ditentukan dengan berdasarkan interpolasi absorbansi analit ke

dalam persamaan regresi linier standar kafein sehingga didapatkan konsentrasi (x) dalam satuan %. Penetapan kadar alkaloid dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi $y = bx + a$ yang didapat pada kurva kalibrasi untuk mendapatkan konsentrasinya. Nilai konsentrasi sampel yang didapat kemudian didistribusikan lagi ke dalam rumus perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Kadar : } \frac{C \times V \times Fp}{W}$$

Ket :

C = Konsentrasi senyawa dalam larutan sampel

V = Volume larutan sampel (mL)

Fp = Faktor pengenceran

W = Berat sampel (g)

4.9 Aplikasi Metode Analisis Pada Penetapan Kadar Alkaloid Total

Sumber data yang didapat pada penelitian ini ialah data primer dimana data didapat dari hasil pengukuran secara langsung konsentrasi alkaloid dalam sampel biji kakao dengan menggunakan instrumen KCKT di Laboratorium Terpadu Universitas dr. Soebandi. Data yang didapat dibuat kurva kalibrasi dan ditentukan nilai-nilai parameter validasi metode analisis yaitu selektivitas, linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, presisi dan akurasi.

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Data Umum

5.1.1 Determinasi Tanaman

Hasil determinasi tanaman yang telah dilakukan di Politeknik Negeri Jember menyatakan bahwa tanaman tersebut adalah bagian biji tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) dan hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 4.

5.1.2 Ekstraksi Sampel

Hasil ekstraksi maserasi yang telah dilakukan pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.) didapatkan hasil pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Hasil Ekstrak Kering	Hasil Penimbangan
Bobot sampel	500 gram
Bobot ekstrak kental	34,55 gram
% Rendemen	6,91 %

5.1.3 Partisi Cair-cair

Hasil partisi yang telah dilakukan pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.) didapatkan hasil pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil Perhitungan Rendemen Partisi

Massa Ekstrak Kental	Massa Partisi	% Rendemen
5 gram	305,9 gram	6,11 %

5.1.4 Identifikasi Alkaloid

pengujian identifikasi alkaloid dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa alkaloid yang terkandung dalam ekstrak etanol biji kakao. Hasil uji identifikasi alkaloid dapat dilihat pada tabel 5.1. Berdasarkan hasil uji

identifikasi alkaloid ekstrak etanol biji kakao menunjukkan bahwa sampel mengandung senyawa alkaloid.

Tabel 5.3 Uji Identifikasi Alkaloid

Uji senyawa	Pereaksi	Hasil Uji Tabung	Teoritis	Kesimpulan
Alkaloid	<i>Mayer</i>	Endapan berwarna putih	Endapan berwarna putih (Sulistyarini, <i>et al.</i> , 2019).	+
	<i>Dragendrof</i>	Berwarna jingga-kecoklatan	Endapan berwarna jingga kecoklatan (Sulistyarini, <i>et al.</i> , 2019).	+
	<i>Bouchardat</i>	Endapan berwarna coklat	Endapan berwarna coklat (Sulistyarini, <i>et al.</i> , 2019).	+

Keterangan + : mengandung senyawa

- : tidak mengandung senyawa

5.2 Data Khusus

5.2.1 Optimasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

1) Optimasi Laju Alir

Optimasi laju alir ditentukan dengan beberapa variasi yaitu 1,0; 1,2; dan 1,4 ml/menit. Kemudian dapat dilihat laju alir yang optimum dalam optimasi laju alir adalah 1 mL/menit.

Tabel 5.4 Optimasi laju alir

Laju Alir	<i>Symmetry</i>	N > 2000	tR	Rs
1,0	0,615	2124	3,708	1,55
1,2	0,619	1002	2,944	1,45
1,4	0,612	645	2,706	1,28

Laju alir 1 mL/menit dipilih karena memenuhi persyaratan pada nilai $N > 2000$, *symmetry*, dan resolusinya. Oleh karena itu, waktu retensi pada laju air 1 mL/menit memiliki nilai yang baik dibandingkan variasi laju alir 1,2 dan 1,4 mL/menit.

2) Penentuan Fase Gerak

Penentuan fase gerak dilakukan untuk mendapatkan profil kromatogram senyawa kafein yang mempunyai bentuk *peak* yang bagus. Menurut Agus Siswanto, (2016) mengatakan bahwa pemilihan fase gerak yang sesuai dilakukan berdasarkan indikator yaitu memiliki waktu retensi yang pendek <10 menit. Data nilai waktu retensi komposisi fase gerak terpilih yang didapat dari standar kafein terdapat pada tabel 5.5. Komposisi fase gerak yang menghasilkan waktu retensi <10 menit, dan pemisahan puncak terbaik dipilih untuk digunakan pada penelitian ini.

Tabel 5.5 Penentuan fase gerak

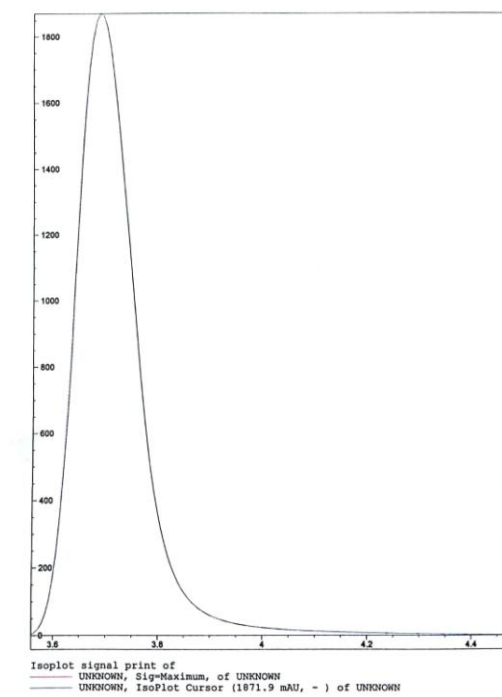
Komposisi Fase Gerak	<i>symmetry</i>	N > 2000	tR
Metanol: <i>aquabidesilata</i> (50:50)	0,60	929	1,094
Metanol: <i>aquabidesilata</i> (60:40)	0,25	1391	1,612
Metanol: <i>aquabidesilata</i> (30:70)	0,92	2192	3,700

Pada perbandingan komposisi fase gerak yang dterpilih untuk analisis yaitu metanol:*aquabidesilata* (30:70).

3) Penentuan Panjang Gelombang

Penentuan panjang gelombang menggunakan larutan baku standar kafein konsentrasi 100 ppm. Panjang gelombang maksimum senyawa kafein dapat ditentukan dengan menggunakan *spectrum* pada instrumen KCKT yang menggunakan detektor *Photodiode Array* (PDA). Panjang gelombang maksimum yang dihasilkan pada *spectrum* KCKT adalah 272 nm. Panjang gelombang maksimum yang muncul kemudian ditinjau pada metode validasi yang akan digunakan. Hasil yang

diperoleh adalah panjang gelombang 272 nm yang menghasilkan kromatogram cukup tajam.



Gambar 5.2 Isoplot 2D panjang gelombang 272 nm

5.2.2 Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan 6 kali pengulangan injeksi ke KCKT dengan konsentrasi 500 ppm dari induk standar kafein.

Tabel 5.6 Uji kesesuaian sistem (UKS)

Replikasi	tR	Luas Area
1	3,684	8239.04492
2	3,688	9142.13379
3	3,683	9127.29688
4	3,693	9141.58301
5	3,689	9117.36426
6	3,681	9156.75977
SD	0,2584569897	366.8524688
Rata-rata	3,686333333	8987.363772
RSD	0,07011221283	0,04081869591

Hasil UKS menunjukkan keterulangan waktu retensi dan luas area yang memenuhi persyaratan yaitu RSD <2 % (Ganjar dan Rahman, 2007). Dimana pada keterulangan waktu retensi menghasilkan RSD 0,070% dan pada keterulangan luas area menghasilkan RSD 0,040 %.

5.2.3 Validasi Metode Analisis

1) Selektivitas

Pada uji parameter selektivitas dapat dilakukan dengan penginjekan sampel biji kakao kemudian diamati dari pemisahan puncak kafein dalam sampel biji kakao dan dinyatakan dengan nilai resolusi (R_s) yang dihasilkan.

Tabel 5.7 Selektivitas

Replikasi	Nama Pengujian	R_s	tR	Purity Factor
1	Standar tanpa pengganggu	-	3,683	999.620
2	Sampel tanpa pengganggu	-	3,664	999.645
3	Standar dengan analit lain	1,49	3,637	999.683
4	Sampel dengan analit lain	1,57	3,648	999.689

Menurut AOAC (2013) nilai keberterimaan resolusi yang baik yaitu $\geq 1,5$. Tabel 5.7 menunjukkan hasil resolusi kafein pada sampel biji kakao dan standar, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa sudah memenuhi kriteria resolusi maka metode analisis yang digunakan pada penelitian ini memiliki selektivitas yang baik karena dapat memisahkan senyawa kafein (analit) dari senyawa lainnya dalam sampel (Harmita, 2004).

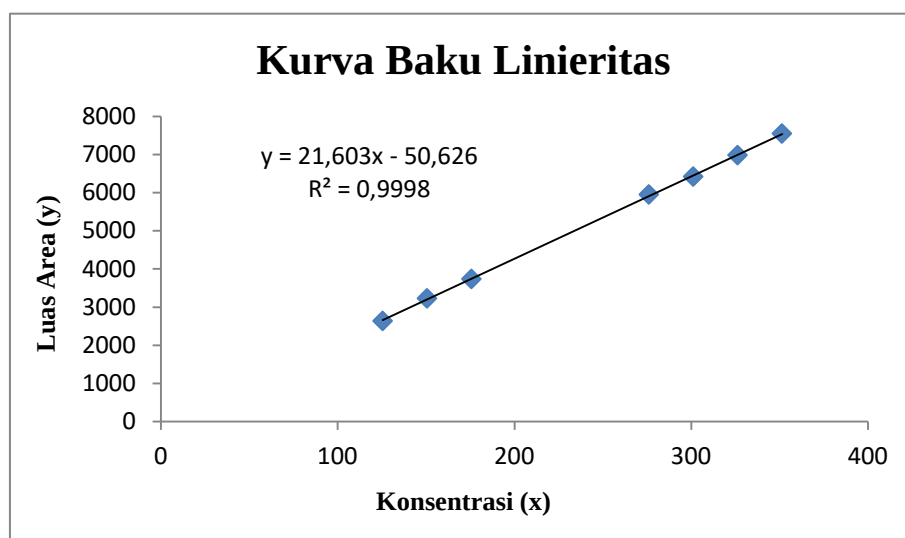
2) Linieritas

Linieritas ditentukan dengan membuat larutan induk standar kafein dengan 7 titik konsentrasi 125 ppm, 150 ppm, 175 ppm, 275 ppm, 300

ppm, 325 ppm, dan 350 ppm. Kemudian masing-masing konsentrasi diinjek dan diamati areanya. Selanjutnya dibuat persamaan regresinya.

Tabel 5.8 Linieritas

Konsentrasi (x)	Luas Area (y)
125,5	2637.81079
150,6	3229.76904
175,7	3738.09863
276,1	5953.24316
301,2	6422.93457
326,3	6984.84131
351,4	7551.07324
$y = 21,603x - 50,626$	
$r = 0,9998$	
$V_{x0} = 0.5525478261 \%$	



Gambar 5.3 Kurva Baku Linieritas

Dari hasil uji linieritas diperoleh persamaan regresi linier $y = 21,603x - 50,626$ dengan nilai Koefisien korelasi (r) = 0,9998 untuk $n \geq 7$. Pada penelitian ini didapat nilai V_{x0} sebesar 0,552%. Koefisien menunjukkan nilai $r > 999$ sedangkan persyaratan nilai $V_{x0} \leq 2 \%$ (Mulja dan Hanwar, 2003). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat

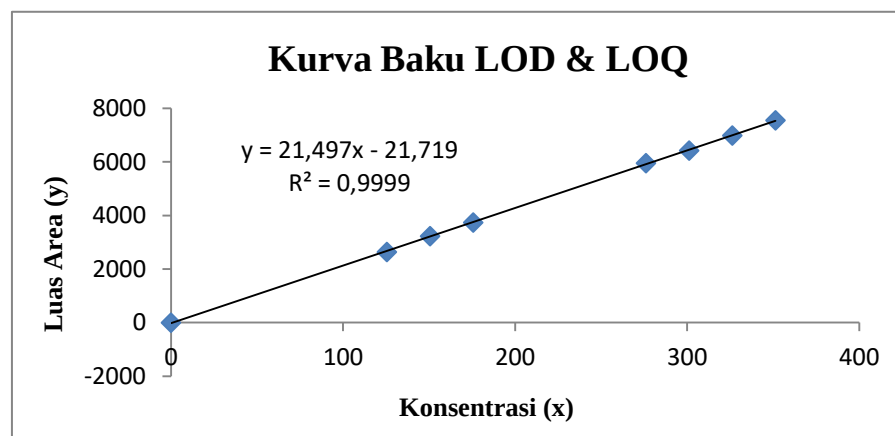
hubungan yang linier antara konsentrasi standar kafein dengan area sehingga persamaan linieritas tersebut dapat digunakan untuk penetapan kadar alkaloid pada sampel biji kakao.

3) Limit deteksi (LOD) dan Limit Kuantitasi (LOQ)

Penentuan uji batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dilakukan dengan penginjekan 8 titik konsentrasi larutan standar kafein dengan menggunakan konsentrasi hasil optimasi sampai konsentrasi terkecil yaitu 350 ppm, 325 ppm, 300 ppm, 275 ppm, 175 ppm, 150 ppm, 125 ppm, dan 0 ppm.

Tabel 5.9 LOD & LOQ

Konsentrasi (x)	Luas Area (y)
0	0
125,5	2637.81079
150,6	3229.76904
175,7	3738.09863
276,1	5953.24316
301,2	6422.93457
326,3	6984.84131
351,4	7551.07324
$y = 21,497x - 21,719$	
$r = 0,9999$	
$V_{x0} = 0.6706833194 \%$	
$SD = 226.5707164$	
$LOD = 31.61893051$	
$LOQ = 105.396435$	



Gambar 5.4 Kurva Baku LOQ & LOQ

Hasil uji limit deteksi dan limit kuantitasi diperoleh dari hasil persamaan regresi $y = 21,497x - 21,719$ dengan $r = 0,9999$ serta nilai SD yang diperoleh yaitu 226.570. Dari persamaan regresi pada tabel 5.9 maka diperoleh nilai limit deteksi (LOD) sebesar 31.618 ppm dan nilai limit kuantitasi (LOQ) sebesar 105.396 ppm.

4) Presisi

Uji presisi dapat dilakukan dengan larutan standar baku yang telah dipreparasi sampai konsentrasi 250 ppm. Kemudian dilakukan penginjekan sebanyak 6 kali, lalu hitung nilai %KV yang didapat harus $< 2\%$.

Tabel 5.10 Presisi

Replikasi	Konsentrasi	y	X	$\bar{x}$	SD	% KV
1	250	815.61926	8.666054891	8.818118	0.48694	0.055221
2	250	819.27833	8.904027706			
3	250	814.90785	8.619787331			
4	250	825.67448	9.320010406			
5	250	819.65567	8.928568548			
6	250	813.23877	8.470263398			

Hasil uji presisi yang dilakukan dengan membuat larutan standar baku konsentrasi direplikasi sebanyak 6 kali dengan metode

repeatability menunjukkan nilai %KV pada konsentrasi 250 ppm kurang dari 2% dimana nilai tersebut telah memenuhi persyaratan untuk uji presisi (AOAC, 2013).

5) Akurasi

Penentuan uji akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku standar atau adisi standar yaitu dengan membuat 3 seri konsentrasi. Kemudian masing-masing konsentrasi dengan 3 kali replikasi. Dari hasil pengukuran, didapatkan nilai AUC kemudian diolah menggunakan persamaan kurva baku sehingga diperoleh data konsentrasi terukur dan konsentrasi sebenarnya. Hasil perhitungan akurasi pada tabel 5.11.

Tabel 5.11 Akurasi

Konsentrasi	y	x	$\bar{x}$	% Recovery	$\bar{x}$ % Recovery	SD	% RSD
30 %	2138.086	315.583	313.968	101.148 %	100.684 %	2.27615	0.00724
	2120.728	311.380		99.945 %			
	2135.384	314.996		100.960 %			
45 %	2290.118	348.540	349.915	100.155%	100.342 %	4.22495	0.01207
	2280.939	346.550		99.583 %			
	2318.336	354.657		101.290 %			
60 %	2453.982	384.064	382.949	100.016 %	99.726 %	11.09706	0.02897
	2395.277	371.337		96.702 %			
	2497.263	393.447		102.460 %			

Hasil nilai akurasi standar kafein di dalam matriks dengan *standar addition method* memenuhi persyaratan % *recovery* dengan syarat rentang yaitu 92-105% dalam konsentrasi analit dalam sampel 1% sesuai persyaratan yang ditetapkan oleh (AOAC, 2013).

5.2.4 Penetapan Kadar Alkaloid Total

Pada penetapan kadar alkaloid total dalam ekstrak etanol biji kakao dihitung berdasarkan hasil validasi metode analisis yang telah dilakukan sebelumnya menggunakan sistem Kromatografi Cair kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik dengan komposisi fase gerak metanol:*aquabidesilata* (30:70), fase diam kolom *poroshell* 120 EC C-18, kecepatan alir 1,0 mL/menit dan dengan detektor *Photodiode Array Detector* (PDA) pada panjang gelombang 272 nm. Melalui tahap validasi diperoleh parameter-parameter validasi yang telah memenuhi syarat yaitu selektivitas, linieritas, limit deteksi (LOD), limit kuantitasi (LOQ), presisi dan akurasi. Penetapan kadar alkaloid total dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = 18.307x - 204.03$, kemudian dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar alkaloid total} = \frac{\text{konsentrasi } \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ volume sampel}}{\text{berat sampel}} \times \text{fp} \quad (\text{Diah, 2021})$$

Tabel 5.12 Penetapan kadar alkaloid total

Replikasi Sampel	y	x	Kadar alkaloid	$\bar{x}$ Kadar alkaloid	SD	% RSD
1	486.77612	37.73453433	3.018762746	3.395960806	5.03918772	0.118045
2	574.42242	42.52211832	3.374771295			
3	671.20551	47.80878953	3.794348376			
$\bar{x}$ Kadar alkaloid $\pm$ SD				3.395960806 $\pm$ 5.03918772		

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Determinasi dan Ekstraksi Sampel Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

6.1.1 Determinasi Tanaman Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Determinasi tanaman pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui identitas yang benar dan jelas dari tanaman yang diteliti sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan tanaman yang akan diteliti (Diniatik, 2015). Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) didapatkan dari PUSLITKOKA Jember lalu dideterminasi di Politeknik Negeri Jember. Berdasarkan hasil determinasi, menyatakan benar bahwa bagian tanaman yang diidentifikasi merupakan biji dari buah Kakao dengan nama ilmiah *Theobroma cacao* L. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 4.

6.1.2 Ekstraksi Maserasi dan Partisi Cair-Cair Biji Kakao

1) Ekstraksi Maserasi

Serbuk biji kakao selanjutnya masuk ke tahap ekstraksi. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstraksi maserasi. Proses ekstraksi bertujuan untuk memisahkan atau menarik senyawa dari simplisia menggunakan pelarut dan metode tertentu (Hanani, 2015). Serbuk biji kakao diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Maserasi dipilih sebagai metode ekstraksi karena memiliki keuntungan yaitu mudah dilakukan, peralatan yang dibutuhkan sederhana, dan tidak menggunakan panas sehingga kecil kemungkinan senyawa yang terekstrak menjadi rusak / terurai

(Mauludina dkk., 2011; Susanty dan Bachmid, 2016). Selain itu, maserasi memiliki fleksibilitas yang baik karena dapat dilakukan dalam beberapa jam hingga beberapa minggu sehingga dapat menyesuaikan dengan karakteristik simplisia dan waktu penelitian (Sarker dan Nahar, 2012). Pada penelitian ini digunakan pelarut etanol sebagai pelarut dalam metode maserasi karena etanol dapat mengekstrak senyawa polar dan nonpolar sehingga dapat menarik sebagian besar senyawa dalam simplisia (Houghton dan Raman, 2011). Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% karena lebih mudah masuk kedalam dinding sel daripada pelarut etanol dengan konsentrasi lebih rendah (Tifani, 2012).

Proses ekstraksi dilakukan dengan menimbang sebanyak 500 gram sampel biji kakao dan direndam pelarut etanol 96% sebanyak 2500 mL. Sampel biji kakao dimaserasi selama 5 hari dan dilakukan pengadukan yang bertujuan agar menyeimbangkan konsentrasi sampel dalam pelarut. Setelah diekstraksi selama 5 hari hasil residu dapat dilakukan remaserasi selama 24 jam dengan menggunakan pelarut baru. Remaserasi dilakukan bertujuan untuk menarik senyawa yang tertinggal. Kemudian dilakukan penyaringan dan Filtrat yang didapat dipekatkan dengan *waterbath* dengan suhu 50°C Filtrat hasil remaserasi dipekatkan kembali sama seperti maserasi. Proses ini bertujuan menguapkan pelarut yang tersisa pada ekstrak sekaligus memekatkan ekstrak (Wardaningrum, 2020). Pemilihan suhu 50°C dikarenakan titik didih etanol yaitu 78% sehingga lebih menguap dari pada air (Fahmi *et*

al, 2014). Setelah di *waterbath* akan menghasilkan ekstrak kental yang nantinya dapat dihitung % rendemen dari ekstrak biji kakao.

Penentuan rendemen memiliki tujuan untuk mengetahui kadar senyawa metabolit yang terlarut dalam pelarut. Namun tidak menentukan jenis senyawa metabolit yang terlarut dalam pelarut (Sari *et al*, 2020). Pada penelitian ini diperoleh hasil rendemen sebanyak 6,91% dari 500 gram serbuk biji kakao. Syarat rendemen ekstrak kental yaitu tidak kurang dari 10% (Farmakope Herbal Indonesia, 2017). Hasil rendemen ini membuktikan bahwa lama waktu ekstraksi berpengaruh terhadap rendemen. Mardina (2011) menyatakan bahwa semakin lama waktu ekstraksi, semakin tinggi rendemen yang diperoleh, karena kesempatan bereaksi antara bahan dengan pelarut semakin lama sehingga proses penetrasi pelarut kedalam sel bahan semakin baik yang menyebabkan banyak senyawa yang berdifusi keluar sel. Pada penelitian Nuraskin *et al* (2022) didapat hasil rendemen ekstrak kental biji kakao sebesar 4,75% dengan lama waktu maserasi 3 hari. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 6.

2) Partisi Cair-Cair

Ekstrak etanol biji kakao diekstraksi kembali dengan metode partisi cair-cair. Partisi cair-cair ini bertujuan untuk memisahkan senyawa kafein dari senyawa-senyawa lainnya. Ekstrak etanol biji kakao ditambah dengan kalsium karbonat kemudian dipartisi dengan pelarut kloroform. Penambahan kalsium karbonat berfungsi untuk memutuskan

ikatan kafein dengan senyawa lain sehingga kafein akan ada dalam kondisi basa bebas (alkaloid) (Maramis *et al.*, 2013). Setelah senyawa kafein dalam kondisi basa bebas, kemudian ditarik dengan pelarut kloroform.

Pelarut kloroform digunakan sebagai pelarut partisi dalam penelitian ini karena tidak bercampur dengan pelarut sebelumnya. Selain itu, pelarut kloroform merupakan pelarut organik yang memiliki kemampuan untuk menarik senyawa organik dengan baik. Senyawa kafein (alkaloid) dalam kondisi basa akan memiliki kelarutan yang sangat baik pada pelarut organik sehingga dapat ditarik menggunakan kloroform (Robinson, 1995). Pelarut kloroform yang sudah dipartisi kemudian diuapkan dalam lemari asam hingga didapatkan ekstrak kering berbentuk kristal (Sanjaya, *et al.*, 2020). Ekstrak kering berbentuk kristal ini yang disebut ekstrak kafein. Ekstrak kafein kemudian dianalisis kadar dan divalidasi metode menggunakan KCKT *Photodiode Array Detector* (PDA).

6.2 Identifikasi Alkaloid

Ekstrak etanol biji kakao yang sudah dipekatkan kemudian diuji kualitatif untuk mengetahui kandungan senyawa kafein dalam ekstrak. Uji kualitatif yang dilakukan meliputi uji *Mayer*, uji *Dragendorf*, dan uji *Bouchardat*. Ketiga uji kualitatif tersebut bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa alkaloid dalam ekstrak etanol biji kakao. Ekstrak biji kakao terbukti secara kualitatif mengandung senyawa alkaloid yang dibuktikan dengan adanya endapan berwarna putih pada

uji *Mayer*, endapan berwarna jingga-coklat pada uji *Dragendorf*, dan endapan berwarna coklat pada uji *Bouchardat*. Ketiga uji tersebut menegaskan keberadaan senyawa alkaloid dalam ekstrak etanol biji kakao. Ekstrak biji kakao mengandung beberapa golongan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tannin, dan alkaloid (Wibawa, 2021). Oleh karena itu, diperlukan ekstraksi cair-cair untuk memisahkan senyawa kafein dari senyawa lainnya.

6.3 Optimasi KCKT

Pengembangan metode optimum KCKT dilakukan dengan menganalisis parameter laju alir, komposisi fase gerak, panjang gelombang. Pengembangan metode optimum dilakukan dengan cara menyuntikkan standar baku kafein 500 ppm. Penentuan laju alir dilakukan pada tiga variasi laju alir yaitu 1,0; 1,2; dan 1,4 ml/menit. Pada laju alir 1,0 ml/menit menghasilkan nilai *symmetry* dan plat teori (N) yang lebih besar serta waktu retensi yang lebih cepat. Sedangkan variasi laju alir 1,2 dan 1,4 ml/menit nilai *symmetry* dan plat teori (N) lebih kecil dan waktu retensinya yang lebih pendek karena tekanan dari pompa yang menyebabkan analit tertahan pada kolom sehingga lebih lama teresolusi. Penyebab tekanan pompa yang meningkat dikarenakan beban dari fase gerak yang membawa analit menjadi lebih besar sehingga menyebabkan peningkatan dari tekanan pompa KCKT. Sehingga dipilih laju alir 1,0 ml/menit karena menghasilkan nilai N 2124 dimana telah memenuhi syarat nilai $N > 2000$ pada larutan standar kafein 500 ppm (A. C. Moffat *et al.*, 2012).

Berdasarkan hasil analisis optimasi fase gerak dengan larutan standar kafein 50 ppm dan pada panjang gelombang 272 nm. Fase gerak yang digunakan

kombinasi dari metanol dan *aquabidestilata*. Pertama menggunakan perbandingan 50:50 yang menghasilkan kromatogram yang tidak tajam sehingga dilakukan uji coba pada perbandingan lainnya. Perbandingan kedua 60:40 menghasilkan kromatogram yang tidak tajam memuncak sehingga dapat dikatakan tidak optimal. Perbandingan ketiga yang pernah dicoba seperti penelitian Denis Yulius, (2018) yaitu perbandingan 30:70 dengan *aquabidestilata* yang lebih banyak, hasil pada perbandingan ini memiliki puncak yang cukup tajam sehingga dapat dikatakan optimal. Dari ketiga variasi perbandingan yang telah dilakukan, pada perbandingan 30:70 didapatkan kromatogram yang bagus yaitu *peak* yang dihasilkan tajam dan hanya muncul 1 *peak* serta menghasilkan analisis yang lebih cepat yaitu pada *retention time* 3,7 menit.

Panjang gelombang pengamatan ditentukan dengan instrumen KCKT dengan detektor PDA. Keuntungan KCKT dengan detektor PDA yaitu dapat mengamati absorbansi senyawa pada panjang gelombang maksimum senyawa tersebut. Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan menyuntikkan larutan standar baku kafein kemudian dilihat isoplot 2D sehingga dapat ditentukan panjang gelombang maksimumnya. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 272 nm. Pada penelitian yang dilakukan oleh Fajriana dan Fajriati (2018) meenyebutkan bahwa panjang gelombang serapan maksimum senyawa kafein yaitu pada 272 nm. Oleh karena itu pada penelitian ini pengamatan panjang gelombang untuk analisis senyawa kafein dilakukan pada 272 nm.

6.4 Uji Kesesuaian Sistem

kesesuaian sistem dilakukan pada kondisi analisis yang sudah optimal. Berdasarkan pengembangan kondisi analisis optimum didapatkan fase gerak dengan komposisi metanol:*aquabidestilata* (30:70), laju alir 1,0 ml/menit, dan panjang gelombang 272 nm. Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk mengetahui nilai standar deviasi relatif (RSD) respon detektor yaitu luas area di bawah kurva (AUC) dan waktu retensi senyawa. Pengujian ini dilakukan dengan menyuntikkan standar baku kafein konsentrasi 500 ppm sebanyak 6x replikasi. Nilai RSD yang diperoleh untuk luas area yaitu 0.040% dan waktu retensi 0.070%. Nilai RSD menunjukkan derajat variasi hasil penelitian, dimana semakin kecil nilai RSD maka variasi data yang dihasilkan akan semakin baik. Nilai RSD dapat dikatakan memenuhi syarat keberterimaan jika $<2\%$ (AOAC, 2013). Berdasarkan data hasil uji kesesuaian sistem, nilai RSD luas area dan waktu retensi telah memenuhi syarat keberterimaan.

6.5 Validasi Metode Analisis

Pengujian senyawa kafein dilanjutkan ke tahap validasi metode analisis. Validasi metode analisis bertujuan untuk membuktikan bahwa suatu metode analisis mampu menghasilkan data yang dapat diterima dan dapat dipercaya. (Christian, 2004). Parameter validasi yang diuji dalam penelitian ini adalah selektivitas, linearitas, LOD, LOQ, presisi, dan akurasi.

6.5.1 Selektivitas

Selektivitas menunjukkan kemampuan metode analisis menentukan analit tertentu dalam sampel secara spesifik dan tidak terpengaruh oleh

adanya pengotor. Selektivitas yang baik harus dimiliki oleh metode kualitatif ataupun kuantitatif (Gumustas *et al*, 2013). Pengujian Selektivitas dilakukan dengan menggunakan hasil pengukuran sampel yang ditambahkan degradan analit, pengotor dan eksipien lain yang dibandingkan dengan hasil pengukuran sampel tanpa penambahan apapun. Selektivitas metode ditunjukkan dengan derajat kesesuaian dari kedua hasil pengukuran (Bae *et al*, 2012) Parameter selektifitas antara lain adalah resolusi kromatogram dan *purity factor*. Nilai resolusi kromatogram merupakan nilai yang menunjukkan bagaimana dua puncak kromatogram terpisah dengan baik. Pemisahan kromatogram dinyatakan baik jika memiliki nilai resolusi lebih besar atau sama dengan 1,5 (Pujamada dkk., 2022). Nilai resolusi yang dipersyaratkan dalam suatu metode yaitu $\geq 1,5$ (Snyder, 2010).

Pada penelitian ini, nilai resolusi standar dengan analit lain dan sampel dengan analit lain memiliki nilai beturut-turut yaitu 1,49 dan 1,57, dimana nilai tersebut telah memenuhi persyaratan resolusi kromatogram yang baik. Nilai *purity factor* menunjukkan faktor kemurnian yang muncul pada kromatogram, dimana dari 4x replikasi penyuntikan ke dalam instrumen menghasilkan nilai 999,620; 999,645; 999,683; dan 999,689. Nilai *purity factor* yang baik memiliki nilai 95% kemurnian (AOAC, 2013). Nilai tersebut menunjukkan bahwa kemurnian senyawa pada puncak kromatogram merupakan puncak yang terdiri dari 1 senyawa. Berdasarkan parameter-parameter ini dapat dikatakan bahwa kromatogram pada penelitian ini telah memenuhi syarat selektivitas.

6.5.2 Linieritas

Linearitas dapat dilihat berdasarkan hasil analisis kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan antara respon instrumen yaitu luas area dan konsentrasi analit pada beberapa seri konsentrasi standar baku (Harvey, 2000). Linieritas menunjukkan kemampuan suatu metode untuk memperoleh seberapa proporsional kurva baku. Linearitas dilakukan dengan menyuntikkan 7 seri standar baku pada rentang konsentrasi 125,5 ppm - 351,4 ppm. Persamaan regresi yang didapatkan yaitu $y = 21,603x - 50,626$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9998 dan V_{xo} sebesar 0,5525%. Nilai linearitas dikatakan baik jika memiliki nilai koefisien korelasi (r) yang mendekati 1 (<1). Sedangkan nilai V_{xo} yang baik adalah lebih kecil dari 2%. Berdasarkan hasil analisis data linearitas yang didapatkan dapat disimpulkan bahwa kurva kalibrasi sudah linear.

6.5.3 LOD dan LOQ

Limit of Detection (LOD) dan *Limi of Quantification* (LOQ) dilakukan dengan dengan membuat 8 seri konsentrasi standar baku dari titik terendah. Parameter LOD dan LOQ bertujuan untuk mengetahui batas deteksi dan batas kuantitasi yang dapat dilakukan oleh instrumen. Nilai batas deteksi dapat dihitung dengan rumus $LOD = 3 \times SD/slope$ dan batas kuantitasi dihitung dengan rumus $LOQ = 10 \times SD/slope$ dimana. SD adalah standar deviasi residual dari kurva kalibrasi dan *slope* merupakan nilai sensitifitas dari metode analisis, semakin besar nilai kemiringan maka semakin besar nilai kesensitifan metode tersebut (D. Apriyanti, *et al.*, 2013). Pada penelitian ini,

Nilai LOD yang didapatkan yaitu sebesar 31.618 ppm dan LOQ sebesar 105.396 ppm.

6.5.4 Presisi

Presisi menunjukkan suatu metode analisis dapat memberikan hasil yang sama atau mirip ketika dilakukan pengulangan. Terdapat 3 macam uji presisi antara lain presisi *repeatability*, presisi *intermediet*, presisi *reproducibility*. Pada penelitian ini dilakukan uji presisi *repeatability* yang dilakukan dengan cara menyuntikkan 6x standar baku konsentrasi 250 ppm. Presisi ditentukan melalui analisis persen RSD yang menunjukkan derajat variasi hasil penelitian. Nilai persen RSD yang didapatkan pada penelitian ini yaitu sebesar 0,055221%. Nilai tersebut telah memenuhi syarat keberterimaan dimana nilai RSD yang baik adalah <2% (AOAC, 2013).

6.5.5 Akurasi

Akurasi merupakan kemampuan suatu metode untuk memberikan hasil pengukuran yang sama atau mendekati ukuran yang sesungguhnya. Akurasi dinyatakan dalam persen perolehan kembali (*recovery*). Pada penelitian ini, uji akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku standar pada sampel (*standard addition method*). Metode ini biasanya dilakukan apabila matriks sampel tidak diketahui (Harvey, 2000). Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah ekstrak kering kafein yang didapatkan dari biji kakao, matriks dari ekstrak ini tidak diketahui sehingga digunakan metode penambahan baku standar. Selain itu, metode penambahan baku standar ini memiliki tujuan untuk memastikan bahwa dalam sampel benar-benar

mengandung kafein. Apabila puncak pada kromatogram sampel yang diduga kafein bertambah tinggi dan luas, maka dapat dipastikan bahwa dalam sampel tersebut mengandung kafein. Metode penambahan standar baku ini dilakukan dengan cara membuat 3x replikasi sampel adisi pada konsentrasi 30%, 45%, dan 60%.

Berdasarkan hasil analisis uji akurasi, didapatkan nilai persen RSD sebesar 0,00724% pada konsentrasi 30%, 0,01207% pada konsentrasi 45%, dan 0,02897% pada konsentrasi 60%. Nilai persen RSD pada ketiga konsentrasi adisi tersebut telah memenuhi syarat keberterimaan dimana nilai RSD yang baik adalah $<2\%$ (AOAC, 2013). Rerata persen prolehan kembali yang didapatkan pada penelitian ini berturut-turut pada konsentrasi adisi 30%, 45%, dan 60% yaitu sebesar 100,684%, 100,342%, dan 99,726%. Penambahan standar baku pada penelitian ini tidak lebih dari 1% sehingga syarat keberterimaan untuk persen perolehan kembali yaitu sebesar 92-105% (Yuwono dkk, 2005). Oleh karena itu, nilai akurasi pada penelitian ini telah memenuhi syarat keberterimaan dan dapat dinyatakan valid.

6.6 Penetapan Kadar Alkaloid Total

Penetapan kadar pada penelitian menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik. Alasan pemilihan metode ini karena waktu analisis yang singkat, kolom yang dapat digunakan kembali, dapat digunakan untuk menganalisis molekul besar dan kecil, serta pengembalian sampel yang mudah (Ganjar dan Rohman, 2007). Hal ini sesuai dengan farmakope bahwasanya KCKT bisa digunakan untuk penetapan kadar salah satunya kadar alkaloid.

Pada penelitian ini menggunakan 6 titik seri konsentrasi standar kafein yaitu, 100 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm dan 3 replikasi sampel yang digunakan yaitu 250 ppm. Setelah membuat larutan standar dan sampel kemudian masuk ke tahap instrumen, sebelum dilakukan penginjekan masing-masing larutan disaring menggunakan penyaring whatman 0,45 μ m. Kemudian dapat dilakukan penginjekan masing-masing larutan ke instrumen. Hasil analisa didapatkan persamaan regresi linier yaitu $y = 18,307x - 204,03$ dengan nilai $r = 0,9973$. Hasil penetapan kadar, didapatkan rerata kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao yaitu sebesar 3,395 % dengan nilai % RSD sebesar 0,118%.

Nilai % RSD menunjukkan ketelitian dari metode yang digunakan penelitian. Jika % RSD < 1% artinya sangat teliti, jika RSD 1- 2 % artinya teliti, jika RSD 2- 5% artinya ketelitian sedang, dan jika > 5 % artinya tidak teliti (Sulistiyani *et al*, 2021). Pada penelitian ini didapat nilai % RSD sebesar 0,118%. Hal ini berarti metode yang digunakan memiliki tingkat ketelitian sangat teliti karena berada pada rentang % RSD < 1%. Oleh karena itu, menggunakan metode KCKT memiliki tingkat ketelitian yang sangat tinggi dikarenakan pada fase gerak disaring terlebih dahulu dengan kertas saring sehingga tingkat ketelitiannya tinggi (Ramly dan Suhendi, 2021).

Berdasarkan hasil penelitian penetapan kadar, didapatkan rata-rata kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao yaitu sebesar 3,395% dalam 12,5 mg ekstrak etanol biji kakao. Hal ini sesuai rentang kadar alkaloid biji kakao total 0,8- 3,7 % (Apriyanto, 2021). Pada penelitian sebelumnya dengan metode KCKT dihasilkan kadar alkaloid total 1,75 % (Rina *et al*, 2016). Hal ini dikarenakan

metode KCKT mempunyai sensitivitas yang tinggi sehingga dapat mendeteksi kadar dalam jumlah nanogram dari bermacam-macam zat (Rohman, 2018).

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

9.1 Kesimpulan

Bersadarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

- 1) Kondisi optimum dari metode analisis KCKT yaitu laju alir 1,0 mL/menit, fase gerak metanol:*aquabidesilata* (30:70), dan panjang gelombang 272 nm.
- 2) Validasi metode analisis mempunyai validitas baik yang memenuhi parameter-parameternya. Nilai selektivitas diperoleh resolusi yang baik dan, linieritas diperoleh $r = 0,9998$ dan $V_{x0} = 0.6706833194$ %, LOD = 31.61893051 dan LOQ = 105.396435, presisi diperoleh %KV = 0,05522130787%, dan pada akurasi diperoleh nilai rata-rata %*recovery* 92-105%.
- 3) Hasil kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan KCKT didapat rata-rata kadar alkaloid yaitu 3.35% dalam 12,5 mg per sampel.

9.2 Saran

Saran yang dapat diambil pada hasil penelitian ini yaitu :

- 1) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai validasi metode analisis dan penetapan kadar pada senyawa lain yang terkandung pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

- 2) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai sampel yang berbeda seperti teh, kopi dan daun sirih dengan menggunakan metode validasi analisis KCKT.
- 3) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada bagian tanaman lain seperti daun, batang, kulit dari biji kakao dengan menggunakan metode validasi analisis KCKT.
- 4) Penelitian ini disarankan dapat digunakan sebagai informasi bagi industri farmasi dan masyarakat mengenai validasi metode analisis KCKT fase terbalik pada penetapan kadar alkaloid total dalam ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

DAFTAR PUSTAKA

- A AC. Moffat, M. D. Osselton. B Analysis of Drugs and Poisons. Widdop, J. Watts (Editors); Clarke s, Fourth Edition (2011) Pharmaceutical Press London UK. 2473 pp.
- Aksara, R., Musa, W.J.A. and Alio, L. 2013. 'Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Mangga (*Mangifera indica* L)'. *Jurnal Entropi*. 8(1). pp. Hal. 514–519.
- Al, H.S. et 2020 "Perbandingan Metode Spektrofotometri UV Dan HPLC pada Penetapan Kadar Kafein dalam Kopi", *Majalah Farmasetika*, Hal. 28–33.
- Alemawor F, F Victoria, P Dzogbefia1, EOK Oddoye & JH Oldham (2009). Effect of *Pleurotus ostreatus* fermentation on cocoa pod husk composition: Influence of fermentation period and Mn²⁺ supplementation on the fermentation process. *African J Biotech* 8(9), 1950-1958.
- Altun, M.L. (2002) 'HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyrone', *Turkish Journal of Chemistry*, 26(4), pp. 521–528.
- AOAC. (2013). *AOAC Validation Botany*.
- Apriyanto, M. (2021). Monograf: Peningkatan Mutu Biji Kakao Petani. Nuta Media.
- Azizah DN, Kumolowati E& FaramayudaF, 2014. Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl₃ pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika Jurnal Farmasi*. 2 (2): 45-49.
- Chaugule, A. et al. (2019) 'Extraction of Caffeine', 6(9), pp. Hal. 11–19.
- Chen, J. et al. (2001) 'Neuroprotection by Caffeine and A 2A Adenosine Receptor Inactivation in a Model of Parkinson ' s Disease', 21, pp. Hal. 2–7.
- Chen, Q. C., & Wang, J. (2001). Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *Journal of chromatography A*, 937(1-2), Hal. 57-64.
- Christian, G. D., 2004. *Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc., Danvers. Pp.126.
- Clara, Maria. 2018. Validasi Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fase Terbalik pada Penetapan Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk Murni Robusta Merek "X". Skripsi. Program Studi Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Cristian Hernandez, A. A. (2017). Polyphenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of extract from *Nephelium lappaceum* L. *Asian Journal of Tropical Medicine*, X (12), 1201-1205.
- Czech, K., Johnson, A., and Rodeberg, N., 2011, Simultaneous Determination Of Caffeine And Theobromine In Local Area Coffee Brews, *Concordia College Journal of Analytical Chemistry*, 2 : 17–22.
- Danila, D. (2022) "Penetapan Kadar Alkaloid Total Dalam Ekstrak Etanol Bunga Lawang (*Illicium Verum* Hook . F) Secara Spektrofotometri Uv-Vis", 2(2), pp. Hal. 102–106.

- Denis, Yulius. 2018. Penetapan Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk Murni Robusta Merek “X” dengan Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fase Terbalik. Skripsi. Program Studi Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Diniatik (2015) ‘Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanolik Daun Kepel (*Stelechocarpus burahol*) (Bl.) Hook F. & Th.) Dengan Metode Spektrofotometri’, *Pharmaqueous : Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 3(1), pp. 1–5. Available at:
- Distantina, S., Fadilah, E.R. Dyartanti, dan E.K. Artati. 2007. Pengaruh rasio berat rumput laut-pelarut terhadap ekstraksi agar-agar. *Ekuilibrium*. 6(2): 53-58.
- Fajriana, N. H., & Fajriati, I. (2018). Analisis kadar kafein kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) pada variasi temperatur sangrai secara spektrofotometri ultra violet. *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 3(2).
- Farmakope Herbal Indonesia Edisi 3. 2017. Kementrian Kesehatan RI.
- Farnsworth, N. R. 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plant. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 55: 59
- Fathoni, Ahmad. 2015. Analisa Secara Kualitatif Dan Kuantitatif Dalam Kopi Bubuk Lokal Yang Beredar Di Kota Palembang Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Penelitian mandiri. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Bhakti Pertiwi Palembang.
- Febri Annuryanti, dkk. (2018) ‘Pengaruh Suhu dan Jumlah Penyeduhan terhadap Kadar Kafein Terlarut dalam Produk Teh Hijau Kering dengan Metode KCKT’.
- Felicia, M. *et al.* (2016) ‘Perancangan Media Komunikasi Visual Produk Cokelat Vicco Kopkar Sekar Jember Abstrak Pendahuluan Rumusan Masalah Batas Lingkup Perancangan Tujuan Perancangan Metode Pengumpulan Data Metode Analisis Data’, pp. 1–10.
- Gandjar, Gholib Ibnu & Abdul Rohman. (2012). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Hadinata, S. and Marianti, M.M. (2020) ‘Analisis Dampak Hilirisasi Industri Kakao di Indonesia’, *Jurnal Akuntansi Maranatha*, 12(1), pp. 99–108. Available at: <https://doi.org/10.28932/jam.v12i1.2287>.
- Hafidhah, N., Hakim, R. F., & Fakhurrazi. (2017). Pengaruh Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis* pada Berbagai Konsentrasi. *Journal Caninus Dentistry*, 2(2), 92–96.
- Hanani, E. 2015. Analisis Fitokimia. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Harmita, 2009. "Analisis Fisikokimia: Kromatografi".
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117–135.
- Harmita. Dan, M. and Perhitungannya, C. (2004) ‘Petunjuk Pelaksanaan Validasi’, 1(3), pp. Hal. 117–135.
- Hartati, S. (2010) ‘The Intergeneric Crossing of *Phalaenopsis* sp. and *Vanda tricolor*’, *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 1(1), pp. Hal. 32–36.
- Harvey, D. 2000. *Modern Analytical Chemistry*. The McGraw-Hill Companies Inc. USA.

- Helmenstein AM (2010). Theobromine Chemistry: Theobromine is Chocolate's Caffeine Relative.
- Houghton, P. J. dan A. Raman. 2011. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Springer US.
- Jones, W.P., Kinghorn, A.D. 2006. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: Sharker, S.D. Latif Z., Gray A.L, eds. *Natural Product Isolation* . 2nd edition. Humana Press. New Jersey
- Katayama, M., & Taniguchi, H. (1989). Fluorometric reactions of purines and determination of caffeine. *Talanta*, 36(12), 1171-1175.
- Kayaputri, I. L., Sumanti, D. M., Djali, M., Indiarto, R., & Dewi, D. L. (2012). *Kajian Fitokimia EKstrak KULit Biji Kakao (Theobroma cacao L.)*. 83–90.
- Kusbandari, A. M. S., & Safitri, W. (2022). Determination of Theobromine Levels in Chocolate Beverage Powder By Hplc Method. *Jurnal Farmasi Klinik Dan Sains*, 2(1), 97.
- Lim, T.K., 2012, *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants, Fruits*, Springer Science Business Media B.V.
- Malangngi Liberty, Meiske Sangi, Jessy Paendong. 2012. Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana Mill.*). *Jurnal Mipa Unsrat Online*, Vol. 1 (1): Hal. 5-10.
- Maramis, R.K., Citraningtyas, G. and Wehantouw, F. (2013) 'Analisis Kafein dalam Kopi Bubuk di Kota Manado Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis', *Jurnal Ilmiah Farmasi - UNSRAT*, 2(4), p. 123.
- Marliana, S.D., Suryanti, V., dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule Jacq. Swartz*) dalam Ekstrak Etanol, *Biofarmasi*.3(1):26-31
- Martono, B. (2014). Karakteristik Morfologi Dan Kegiatan Plasma Nutfah Tanaman Kakao. *Inovasi Teknologi Bioindustri Kakao*, 15–27
- Masfufah, N.L. (2016) 'Isolasi Dan Uji Aktivitas Senyawa Alkaloid Dari Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica L.*) Pada Sel Kanker Payudara T47d', *Nature Methods*, 7(6), p. 2016.
- Mauludina, V. A., I. Tivani, dan J. Santoso. 2011. Perbandingan efektivitas antibakteri ekstrak maserasi dan refluks daun belimbing wuluh (*averrhoa bilimbi l*) terhadap bakteri staphylococcus aureus. 1–5.
- McMurry, J. dan Fay, R.C., 2004. McMurry fay chemistry, 4th edition. Belmont: Pearson Education Internastional
- Meng, C. C., Jalil, A. M. M., and Ismail, A., 2009, Phenolic and Theobromine Contents of Commercial Dark, Milk, and White Chocolates on The Malaysia Market, *Molecules*, 14 (1) : 200-209.
- Nafisah, M. (2014, September). Tukiran., Suyanto., Nurul, Hidayati. 2014, Uji Skrining Fitokimia Pada Ekstrak Heksan, Kloroform, Dan Metanol Dari Tanaman Patikan Kebo (*Euphorbia hirta*), Jurusan FMIPA. In *Prosiding Seminar Nasional Kimia Surabaya* (Vol. 20, pp. 279-286).
- Ningrum, M.P. 2017. Pengaruh Suhu dan Lama Waktu Maserasi terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Rumput Laut Merah (*Euchema cottonii*). *Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang*.
- Nuraskin, C. A., Reca, & Salfiyadi, T. (2022). Identifikasi Ekstrak Metanol Biji

- Kakao (*Theobroma cacao* L.) Sebagai Bahan Dasar Pasta Gigi. Mutiara Kesehatan Masyarakat, 7(2), 67-73
- Pagliarussi, R.S., Freitas, L.A.P. and Bastos, J.K. (2002) 'A quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in Paullinia cupana (guarana) by capillary column gas chromatography', *Journal of Separation Science*, 25(5-6), pp. Hal. 371-374.
- Pavia, D., 1973, Coffee, Tea, or Cocoa, A Trio of Experiments Including The Isolation of Theobromine from Cocoa, *J. Chem*, 50(11) : 791-792.
- Pratiwi, I. 2009. Uji Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Acalypha indica terhadap Bakteri Salmonella choleraesuis dan Salmonella typhimurium. Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Pratiwi, S.P., J. M. (2022). Validasi Metode Analisis Spektrofotometri Uv-Vis dan Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.). In Skripsi. Universitas dr Soebandi.
- Rabbani, I., Armin, F., & Rasyid, R. (2021). A Review: The Use of Chromatographic Methods in Caffeine Analysis during 2000-2020. *IOSR Journal Of Pharmacy And Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 16(1), Hal 14-21.
- Rachmawaty A. Mu'nisa, Hasri. 2017. Analisis Fitokimia Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Sebagai Kandidat Antimikroba. Seminar Nasional LP2M UNM.
- Ramly, E. Suhendi, A. (2021) 'Validasi Metode Analisis Kapsul Rifampicin dengan HPLC. Farmasi Sains. Vol 8 no 1.
- Rina, P., Dewi, F. S., Ellyza, H., & Zainal, A. M. rsquo ud. (2016). Identification of alkaloids of Indonesian Cacao beans (*Theobroma cacao* L.) and its effect on tooth enamel hardness. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10 (15 202-208).
- Robinson, T. 1991. Kandungan Organik Tumbuhan Obat Tinggi. Diterjemahkan Oleh Kokasih Padmawinata, 191-193, ITB. Bandung.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Penerbit ITB. Bandung. Hal 71- 285.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Contreras-Ramos, S. M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., and Lugo-Cervantes, E., 2012, Effect Of Fermentation Time And Drying Temperature On Volatile Compounds In Cocoa. *Food Chemistry*. (132) : Hal. 277-288.
- Rohmah, S. A. A., Muadifah, A., & Martha, R. D. (2021). Validasi Metode Penetapan Kadar Pengawet Natrium Benzoat pada Sari Kedelai di Beberapa Kecamatan di Kabupaten Tulungagung Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 3(2), 120-127.
- Rohman, A., 2009, Kromatografi Untuk Analisis Obat, Graha Ilmu, Yogyakarta, pp. 111, 113, 115.
- Rajo-Poveda, O. et al. (2021) 'Chemometric classification of cocoa bean shells based on their polyphenolic profile determined by rp-hplc-pda analysis and spectrophotometric assays', *Antioxidants*, 10(10).
- Sangi, M., Runtuwene, M.R.J. and Simbala, H.E.I. (2008) 'Analisa Fitokimia Obat Di Minahasa Utara', *Chemistry Progres*, 1(1), pp. 47-53.

- Sangi, M.S., Momuat, L.I., dan Kumaunang, M. 2013. Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Tepung Gabah Pelepah Aren (*Arange pinnata*). Universitas Sam Ratulangi. Manado
- Sanjaya, K., Swandari Paramita and Khalidi, M.R. (2020) 'Jurnal Sains dan Kesehatan', *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 3(6), pp. Hal. 242–247.
- Sanjayadi and Violita, L. B. (2020) 'Penetapan Kadar Tetrasiklin dalam Air Limbah dengan High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detector (HPLC-PDA)', *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 6(2), pp. 237–242.
- Sarker, S. D. dan L. Nahar. 2012. *Natural Product Isolation*. Edisi 3rd. London: Springer New York Dordrecht Heidelberg.
- Sepriyani, R. (2020). Efektivitas Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) Sebagai Antimikroba Terhadap *Streptococcus mutans*.
- Septiana, A. T., Dwiyaniti, H., Muchtadi, D., & Zakaria, F. R. (2005). Kajian Antioksidan Zingiberaceae sebagai Penghambat Oksidasi Lipoprotein Densitas Rendah (LDL) dan Akumulasi Kolesterol pada Makrofag. *Laporan Penelitian Hibah Pekerti Tahun*, 2.
- Septiawan, F. A. (2016). Butilftalat (Dbp) pada Margarin dan Mentega Validasi Metode Analisis Kuantitatif di decara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dengan Detektor Uv (Doctoral dissertation, fakultas MIPA (UNISBA)).
- Setyaningrum, L. *et al.* (2022) 'Development and Validation of RP-HPLC Analysis Method for Determination of Total Alkaloid Content of Soursop (*Annona muricata L.*) Leaf Extract', *Eksakta: Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, 23(03), pp. 175–187.
- Shamsap, F. *et al.* (2008) "Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants Abstract". *Thai J. Pharm. Sci*, 32, pp. Hal.17– 20.
- Student, P. G. (2017) 'Extraction of Caffeine from Coffee and preparation of Anacin drug', 10(1), pp. 236–239.
- Sugiyono. (2017). *Statistika Untuk Penelitian*. Bandung: Penerbit CV ALFA BETA.
- Sulistyarini, I., Sari, D. A., & Wicaksono, T. A. (2019). Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, 56–62.
- Susanti, H., Araaf, N. P. M., & Kusbandari, A. (2020). Perbandingan Metode Spektrofotometri UV Dan HPLC pada Penetapan Kadar Kafein dalam Kopi. *Majalah Farmasetika*, 4(Suppl1), 28–33.
- Susanty, S. dan F. Bachmid. 2016. Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan refluks terhadap kadar fenolik dari ekstrak tongkol jagung (*zea mays l.*). *Jurnal Konversi*. 5(2):87.
- Suyono, S., & Carnovia, C. (2018). Sistem Pendukung Keputusan Menentukan Penyakit Pada Tanaman Kakao Menggunakan Metode Topsis. *Explore: Jurnal Sistem Informasi Dan Telematika*, 9(1), Hal. 78–87.
- Svehla, G., 1990, *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro*, Edisi kelima, diterjemahkan oleh Setiono, L & Pudjaatmaka,

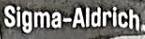
- A. H, Jakarta, Media Pusaka
- Tifani, A. 2012. "Ekstraksi pelarut cair-cair".
- Umar, S., Saafrida, S., & Lucida, H. (2021). Validasi Metoda Analisis Penetapan Kadar Ketoprofen pada Tablet Salut Enterik secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Spektrofotometri UV. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 8(2), 200.
- United States Pharmacopeia (USP) Convention. 2017. *United States Pharmacopeia (USP) national Formulary* 40 NF-35.
- Utami, N., Auliah, A. and Dini, I. (2022) 'Studi Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder beberapa Ekstrak Tai Anging (*Usnea sp.*) dan Uji Bioaktivitasnya terhadap (*Candida albicans*)', *Chemica: Jurnal Ilmiah Kimia dan Pendidikan Kimia*, 23(1), p. 90.
- Utami, R.R., S. Supriyanto., S. Rahardji, dan R. Armunanto. 2017. Aktivitas antioksidan kulit biji kako dari hasil penyangraian biji kako kering pada derajat ringan, sedang dan berat. *Jurnal Agritech*. 37(1): 88-94.
- Wahyuni, D.T. dan S.B. Widjanarko. 2015. Pengaruh jenis pelarut dan lama ekstraksi terhadap ekstrak karotenoid labu kuning dengan metode gelombang ultrasonik. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(2): 390-401.
- Wardani, A.D. (2021) 'Validasi Metode dan Penentuan Kadar Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak (*Annona muricata* L.). Secara Spektrofotometri Uv-Vis Di Desa Kemiri Kabupaten Jember. Universitas dr Soebandi'.
- Wardani, R.K. and Ferry Fernanda, M.A.H. (2016) 'Analisis Kadar Kafein Dari Serbuk Teh Hitam, Teh Hijau dan Teh Putih (*Camellia sinensis* L.)', *Journal of Pharmacy and Science*, 1(1), pp. 15–17.
- Wardaningrum, R. Y. 2020 Perbandingan Aktivita Antioksidan Ekstrak Etanol Terpurifikasi Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas*) Dengan Vitamin E, Skripsi. Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Ngudi Waluyo. Ungaran
- Wibawa, A.A.C. (2021) 'Kapasitas Total Antioksidan Ekstrak Metanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*. L) Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis', *Hydrogen: Jurnal Kependidikan Kimia*, 9(1), p. 30.
- Wijiyanti, D. and Huda, T. (2017) 'Penentuan Ketidakpastian Pengukuran Kadar Kafein pada Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis', *JC-T (Journal Cis-Trans): Jurnal Kimia dan Terapannya*, 1(2), pp. 22–24.
- Yunita, M. S. R., 2012, Validasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fase Terbalik Pada Penetapan Kadar Kafein Dan Teobromin Dalam Cokelat Bubuk Merk "X", *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Yuwono, M. and Indrayanto, G. (2005) 'Validation of Chromatographic Methods of Analysis', *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32(05), pp. 241–260.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Jadwal penyusunan naskah skripsi

No	Kegiatan	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Juni	Juli	Agus
1	Penyusunan proposal skripsi								
	Bimbingan								
	Revisi								
	Fixasi proposal skripsi								
2	Seminar proposal skripsi								
3	Tahap penyiapan bahan dan ekstrak								
4	Tahap pelaksanaan penelitian								
	Ekstraksi								
	Preparasi sampel								
	Optimasi kondisi KCKT								
	Validasi metode								
	Penetapan kadar								
5	Tahap penyusunan hasil skripsi								
6	Seminar hasil skripsi								

Lampiran 2 *Certifikat of Analysis Caffein*



3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigma-aldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name : Caffeine powder, ReagentPlus®
Product Number : C0750-VAR
Batch Number : 0000181333
Source Batch : 0000179446
CAS Number : 58-08-2
Molecular Formula : $C_8H_{10}N_4O_2$
Formula Weight : 194.19
Recommended Retest Date : May 2026
Quality Release Date : 20 Jun 2022

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50 mg/mL, CHCl ₃		
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Water (by Karl Fischer)	≤ 0.5 %	0.3 %
Initial Melting Point	≥ 233 deg	233 deg
Final Melting Point	≤ 238.0 deg	237.0 deg
Purity (HPLC)	≥ 99.0 %	100.0 %
Recommended Retest Period	-----	-----
4 years		



Pramod Kadam(PhD), Manager
Analytical
Bangalore
IN

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchase must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of website or packing slip for additional terms and conditions of sale

Version Number: 01 Doc: 1084343 Page 1 of 1

The branding on the header and/or footer of this document may temporarily not visually match the product purchased as we transition our branding. However, all of the information in the document regarding the product remains unchanged and matches the product ordered. For further information please contact misbranding@sial.com



Lampiran 3 Sertifikat Kloroform



Surat Pernyataan Pembelian Bahan – Bahan Prekursor

Nama : Sindi Anggraiyani
Alamat : Jl. nanas gang 3 no. 8 Patrang
No.Hp : 0853 8365 4320
Instansi/Universitas : Universitas dr. Soebandi
Jurusan : S1 Farmasi
Laboratorium : Kimia
Bahan yang di Beli : Kloroform
Jumlah Packing : 2 liter
Aplikasi : Ekstraksi Cair-Cair

Sehubungan dengan penyediaan produk tersebut diatas,kami menyatakan bahwa:

1. Saya/kami dengan ini menyatakan bahwa Semua produk yang kami beli dari **CV.MAKMUR SEJATI** tersebut betul-betul digunakan untuk keperluan sesuai dengan aplikasi yang telah disebutkan diatas dan tidak dipergunakan untuk pembuatan Narkotika,Psikotropika dan Bahan berbahaya
2. Kami akan membebaskan **CV.MAKMUR SEJATI** atas segala tuntutan pihak Ke tiga maupun sehubungan dengan penyediaan serta penggunaan produk tersebut diatas

Demikian pernyataan ini di buat dengan penuh tanggung jawab.

Jember :



Nama Lengkap : Sindi Anggraiyani

Mengetahui,

Nama: apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm

NIP/Jabatan : 0703068903

NB : Fotokopi KTP/ KTM

Lampiran 4 Surat Hasil Determinasi Tanaman

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
UPA. PENGEMBANGAN PERTANIAN TERPADU
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 076/PL17.8/PG/2023

Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi Sarjana Farmasi No: 1359/FIKES.UDS/U/III/2023 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPA. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Sindi Anggraiyani
NIM : 19040129
Jur/Fak/PT : Prodi Sarjana Farmasi/ Universitas dr. Soebandi

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Malvales; Famili: Sterculiaceae; Genus: Theobroma; Spesies: Theobroma cacao, L

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

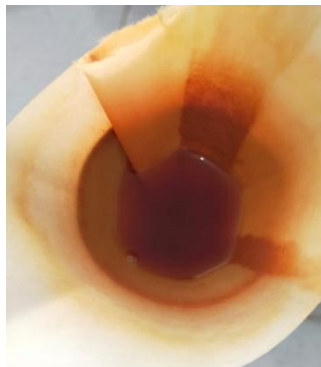
Jember, 10 April 2023
Ka. UPA. Pengembangan Pertanian Terpadu

Ir. Budi Prasetyo, S.Pt, MP, IPM
NIP. 197106212001121001

Lampiran 5 Ekstraksi Maserasi Biji Kakao



Ekstraksi biji kakao dengan
pelarut 2500 mL



Penyaringan hasil ekstraksi



proses pengentalan ekstraksi
menggunakan waterbath

Lampiran 6 Rendemen Ekstrak Etanol 96% Biji Kakao

Rendemen Ekstrak Etanol 96% Biji Kakao

Bobot sampel : 500 gram

Volume pelarut : 2500 mL

Bobot ekstrak kental : 34,55 gram

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{34,55 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 6,91 \%$$

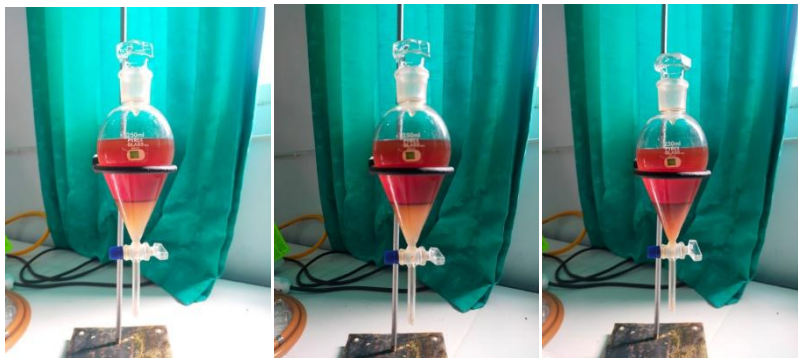
Lampiran 7 Identifikasi Alkaloid



Lampiran 8 Partisi Cair-Cair



Penimbangan ekstrak kental
biji kakao



Replikasi ekstraksi cair-cair
menggunakan kloroform



proses pengentalan
menggunakan waterbath

Lampiran 9 Perhitungan Linieritas

Konsentrasi (x)	Luas Area (y)	yi=bx+a	(y-yi) ²
125.5	2637.81079	2660.5505	517.098504
150.6	3229.76904	3202.7858	728.0930822
175.7	3738.09863	3745.0211	47.92100625
276.1	5953.24316	5913.9623	1542.981249
301.2	6422.93457	6456.1976	1106.433822
326.3	6984.84131	6998.4329	184.7315906
351.4	7551.07324	7540.6682	108.264025
Σ = 1706.8			Σ= 4235.523279
$\bar{x} = 243.8285714$	$y = 21,603x-50,626$	$r = 0,9998$	$V_{x0} = 0.5525478261 \%$

$$S_y = \sqrt{\frac{\Sigma (y-y_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{4235.523279}{5}} = 29.10506237$$

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b} = \frac{29.10506237}{21,603} = 1.347269471$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{\bar{x}} \times 100 \% = \frac{1.347269471}{243,8285714} \times 100 \% = 0.5525478261 \%$$

Lampiran10 Perhitungan LOD dan LOQ

Konsentrasi (x)	Luas Area (y)	yi=bx+a	(y-yi) ²
0	0	0	0
125.5	2637.81079	2676.1645	1471.013974
150.6	3229.76904	3215.7292	197.1171072
175.7	3738.09863	3755.3039	296.0223481
276.1	5953.24316	5913.6027	1571.361312
301.2	6422.93457	6453.1774	914.6330004
326.3	6984.84131	6986.8787	4.15099876
351.4	7551.07324	7532.3268	351.427513
Σ = 1706.8			Σ = 4805.723257
$\bar{x} = 213.35$	$y = 21,497x - 21,719$	$r = 0,9999$	$V_{x0} = 0.61706833194 \%$

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (y-y_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{4805.723257}{5}} = 28.30112853$$

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b} = \frac{28.30112853}{21,497} = 1.316515259$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{\bar{x}} \times 100 \% = \frac{1.316515259}{213,35} \times 100 \% = 0.61706833194 \%$$

$$SD = \sqrt{\frac{4805.723257 - 364145.78}{7}} = 226.5707164$$

$$LOD = \frac{3 \times SD}{b} = \frac{3 \times 226.5707164}{21,497} = 31.61893051$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{b} = \frac{10 \times 226.5707164}{21,497} = 105.396435$$

Lampiran 11 Perhitungan Penentuan Presisi dan Akurasi

PRESISI

$$\begin{aligned}\text{Induk sampel} &= 25 \text{ mg} / 50 \text{ mL} \times 1000 \\ &= 500 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Pengenceran} &= 250 \text{ ppm} / 500 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\ &= 5 \text{ mL}\end{aligned}$$

$$250 \text{ ppm} = \frac{250 \mu\text{g}}{\text{mL}} = \frac{x \mu\text{g}}{10 \text{ mL}}$$

$$2500 \mu\text{g} = 2,5 \text{ mg}$$

AKURASI

Konsentrasi 30 %

$$\text{Sampel} = 40 \text{ mg dalam } 50 \text{ mL}$$

$$\text{Standar } 30 \% = 30 / 100 \times 40 = 12 \text{ mg}$$

$$\text{Konsentrasi } 40 \text{ mg} + 12 \text{ mg} / 50 \text{ mL} \times 1000 = 1040 \text{ ppm}$$

$$1040 \text{ ppm} \times 3 \text{ mL} / 10 \text{ mL} = 312 \text{ ppm}$$

Konsentrasi 45 %

$$\text{Sampel} = 40 \text{ mg dalam } 50 \text{ mL}$$

$$\text{Standar } 45 \% = 45 / 100 \times 40 = 18 \text{ mg}$$

$$\text{Konsentrasi } 40 \text{ mg} + 18 \text{ mg} / 50 \text{ mL} \times 1000 = 1160 \text{ ppm}$$

$$1160 \text{ ppm} \times 3 \text{ mL} / 10 \text{ mL} = 348 \text{ ppm}$$

Konsentrasi 60 %

$$\text{Sampel} = 40 \text{ mg dalam } 50 \text{ mL}$$

$$\text{Standar } 60 \% = 60 / 100 \times 40 = 24 \text{ mg}$$

$$\text{Konsentrasi } 40 \text{ mg} + 24 \text{ mg} / 50 \text{ mL} \times 1000 = 1280 \text{ ppm}$$

$$1280 \text{ ppm} \times 3 \text{ mL} / 10 \text{ mL} = 384 \text{ ppm}$$

Lampiran 12 Perhitungan Validasi Metode Presisi dan Akurasi

AKURASI

Konsentrasi 30 %

$$\text{Replikasi 1} = 315.583 / 312 \times 100 \% = 101.148 \%$$

$$\text{Replikasi 2} = 311.380 / 312 \times 100 \% = 99.945 \%$$

$$\text{Replikasi 3} = 314.996 / 312 \times 100 \% = 100.960 \%$$

$$\text{Rata-rata \% recovery} = 100.684 \% \text{ (memenuhi)}$$

Konsentrasi 45 %

$$\text{Replikasi 1} = 348.540 / 348 \times 100 \% = 100.155 \%$$

$$\text{Replikasi 2} = 346.550 / 348 \times 100 \% = 99.583 \%$$

$$\text{Replikasi 3} = 354.657 / 348 \times 100 \% = 101.290 \%$$

$$\text{Rata-rata \% recovery} = 100.342 \% \text{ (memenuhi)}$$

Konsentrasi 60 %

$$\text{Replikasi 1} = 384.064 / 384 \times 100 \% = 100.016 \%$$

$$\text{Replikasi 2} = 371.337 / 384 \times 100 \% = 96.702 \%$$

$$\text{Replikasi 3} = 393.447 / 384 \times 100 \% = 102.460 \%$$

$$\text{Rata-rata \% recovery} = 99.726 \% \text{ (memenuhi)}$$

PRESISI

$$SD = \frac{\sqrt{(x-x_1)^2}}{n-1}$$

$$SD = \frac{\sqrt{1.185592009}}{6-1} = 0.4869480473$$

$$\%KV = SD / \bar{x}$$

$$\%KV = 0.4869480473 / 8.818118713$$

$$\%KV = 0.05522130787$$

Lampiran 13 Perhitungan Penetapan Kadar Alkaloid Total

$$Y = 18.307x - 204.03$$

Replikasi 1 :

$$y = 18,307 x - 204,03$$

$$486.77612 + 204,03 = 18,307 x$$

$$x = 690.80612 / 18,307$$

$$x = 37,73453433$$

$$\text{Alkaloid total} = 37,73453433 \mu\text{g/mL} \times 100 \text{ mL} \times 10 \text{ mL} / 12,5 \text{ mg}$$

$$\text{Alkaloid total} = 3018.762746 \mu\text{g/mg} \text{ --- } 3.018762746 \text{ mg/g}$$

Replikasi 2 :

$$y = 18,307 x - 204,03$$

$$574.42242 + 204,03 = 18,307 x$$

$$x = 778.45242 / 18,307$$

$$x = 42,52211832 \text{ ppm}$$

$$\text{Alkaloid total} = 42,52211832 \mu\text{g/mL} \times 100 \text{ mL} \times 10 \text{ mL} / 12,6 \text{ mg}$$

$$\text{Alkaloid total} = 3374.771295 \mu\text{g/mg} \text{ --- } 3.374771295 \text{ mg/g}$$

Replikasi 3 :

$$y = 18,307 x - 204,03$$

$$671.20551 + 204,03 = 18,307 x$$

$$x = 875.23551 / 18,307$$

$$x = 47,80878953 \text{ ppm}$$

$$\text{Alkaloid total} = 47,80878953 \mu\text{g/mL} \times 100 \text{ mL} \times 10 \text{ mL} / 12,6 \text{ mg}$$

$$\text{Alkaloid total} = 3794.348376 \mu\text{g/mg} \text{ --- } 3.794348376 \text{ mg/g}$$

Rata-rata kadar alkaloid :

$$3.018762746 + 3.374771295 + 3.794348376 / 3 = 3.395960806$$

$$SD = \sqrt{\frac{50,78682575}{3-1}} = 5,03918772$$

$$RSD = SD / \bar{x}$$

$$RSD = 5,03918772 / 42,68848073$$

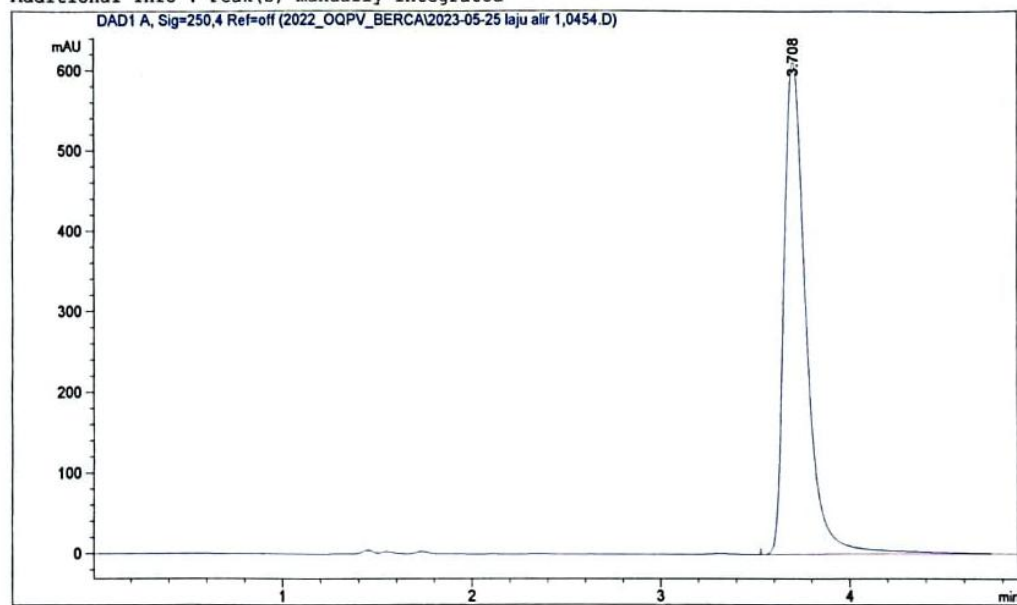
$$RSD = 0.1180456094$$

Lampiran 14 Kromatogram Laju Alir

- Laju alir 1,0

Sample Info : met:air=30:70

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

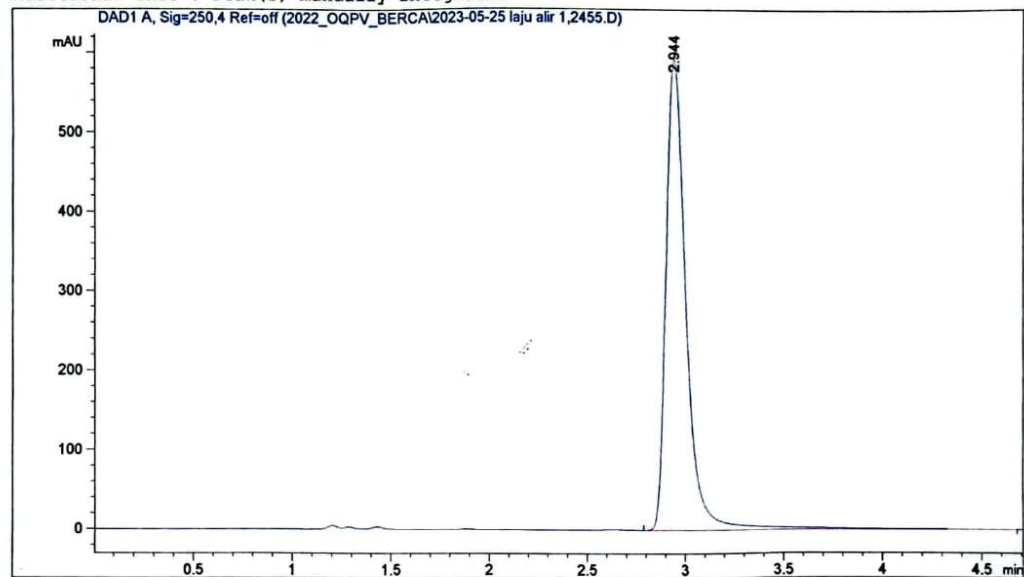
Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
3.708	-	5008.40332	611.80090	0.61	0.1195	5323	-	-

- Laju alir 1,2

Sample Info : met:air=30:70

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

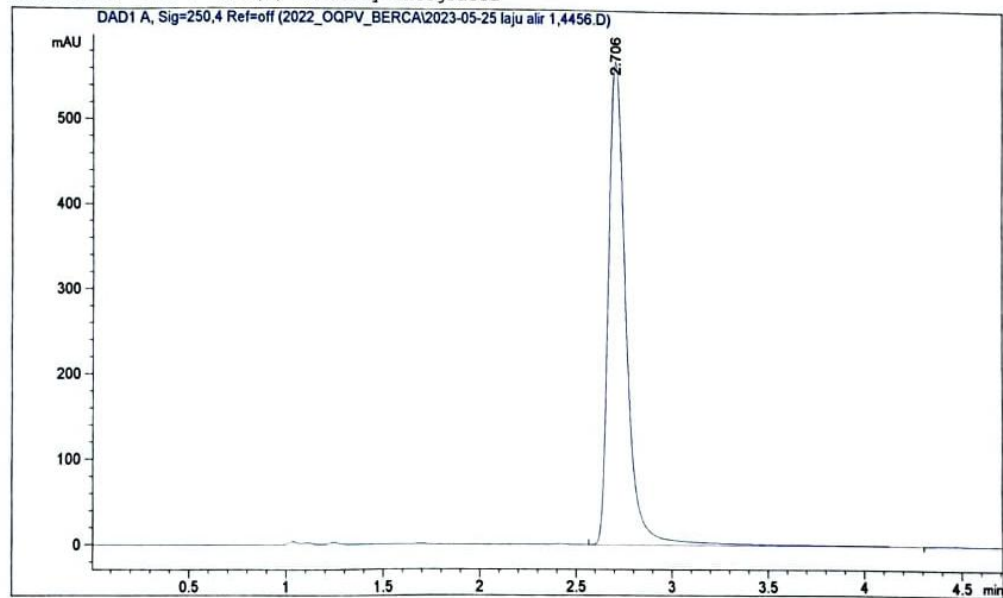
Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
2.944	-	4222.42334	593.70483	0.62	0.1031	4516	-	-

- Laju alir 1,4

Sample Info : met:air=30:70

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

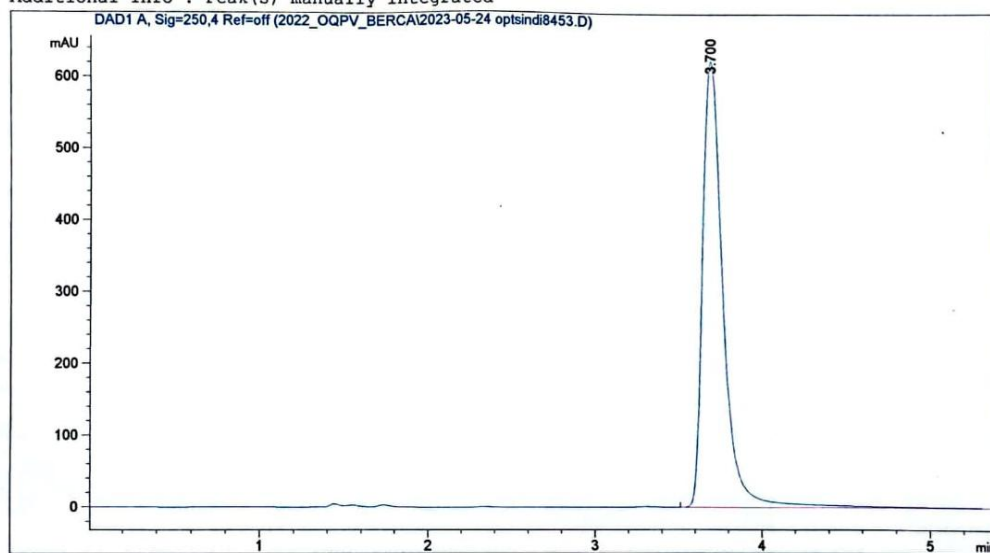
RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
2.706	-	3637.60474	570.66937	0.61	0.0928	4712	-	-

Lampiran 15 Kromatogram Fase Gerak

- Metanol:aquabidesilata (30:70)

Sample Info : met:air=30:70

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

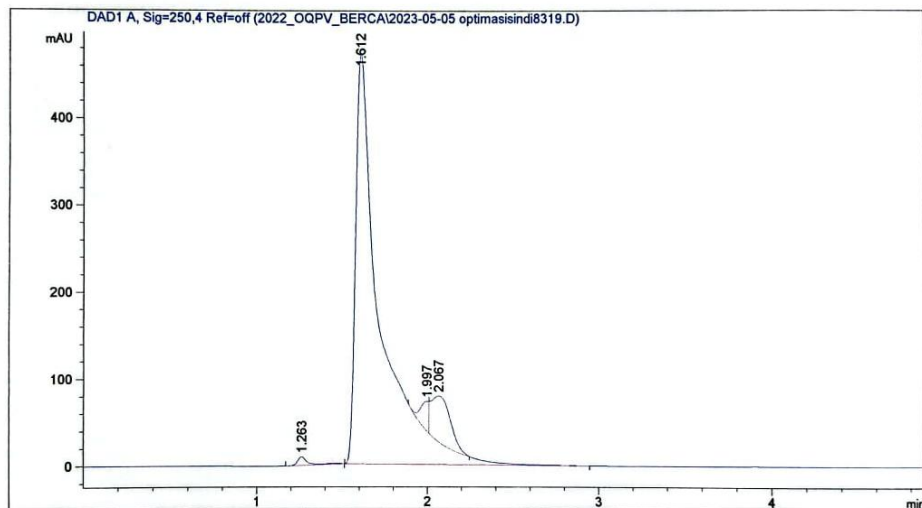
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
3.700	-	5346.09814	625.42139	0.60	0.1236	4968	-	-

- **Metanol:aquabidesilata (60:40)**

Sample Info : met:air=60:40



=====
Area Percent Report with Performance
=====

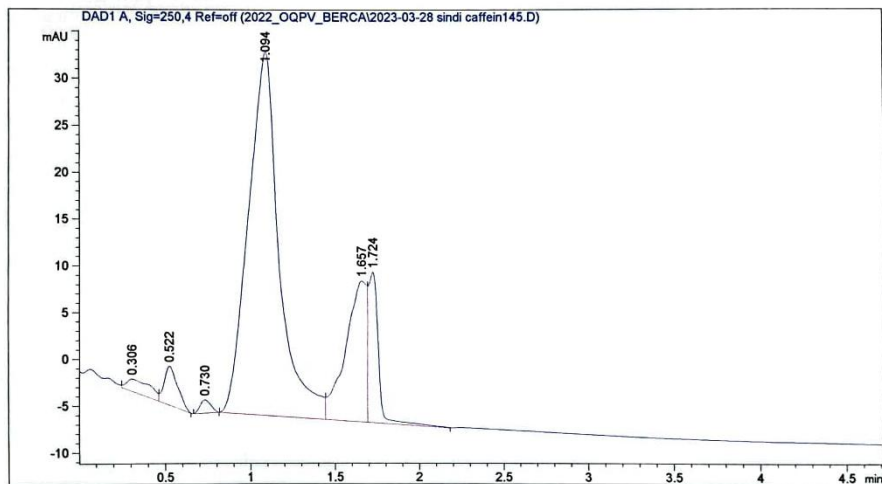
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
1.263	-	41.72761	10.02428	0.55	0.0533	3102	-	-
1.612	-	4747.40283	473.86761	0.25	0.1020	1391	2.64	1.28
1.997	-	107.51930	34.69759	4.13	0.0761	3881	2.54	1.24
2.067	-	424.12540	53.32729	0.60	0.1252	1513	0.40	1.03

- Metanol:aquabidesilata (50:50)

Sample Info : Metanol 50 / Aquabidestilata 50



===== Area Percent Report with Performance =====

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

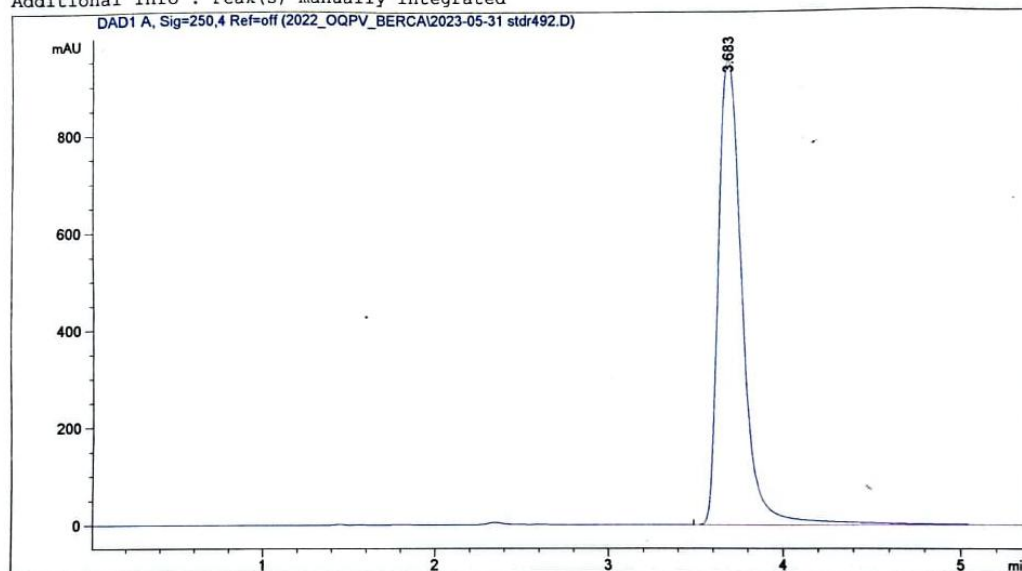
RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
0.306	-	14.29679	1.31884	0.24	0.1617	20	-	-
0.522	-	22.78343	4.20993	0.60	0.0815	227	1.04	1.71
0.730	-	6.19464	1.42086	0.84	0.0724	562	1.59	1.40
1.094	-	493.74194	39.01738	1.21	0.1800	205	1.69	1.50
1.657	-	131.41353	15.20601	3.47	0.1320	929	2.12	1.51
1.724	-	66.24545	16.23336	0.73	0.0627	4178	0.40	1.04

Lampiran 16 Kromatogram validasi metode

- Selektivitas

Sample Info : met:air=30:70/Selektivitas

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

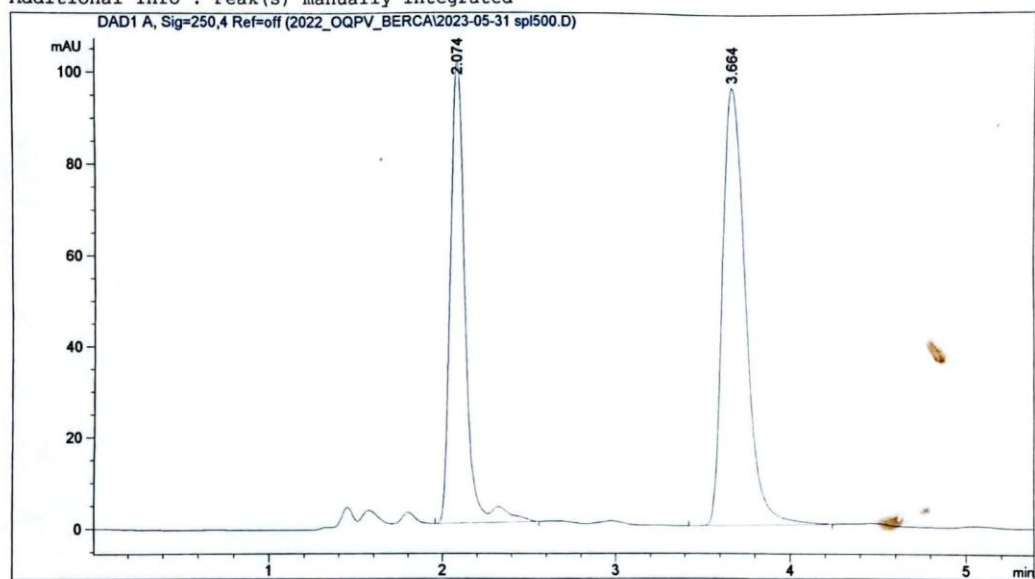
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
3.683	-	9067.18359	951.04095	0.57	0.1407	3794	-	-

Sample Info : met:air=30:70/sampel500ppm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report
=====

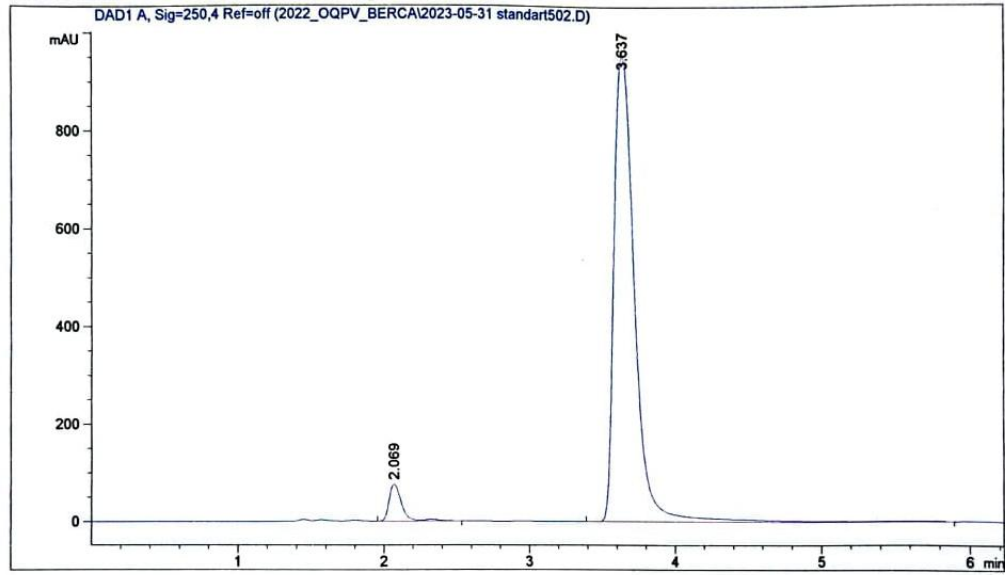
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.074	BV R	0.0885	608.61505	101.18162	40.7681
2	3.664	BB	0.1472	884.25452	96.21077	59.2319

Sample Info : met:air=30:70/adisistandart

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

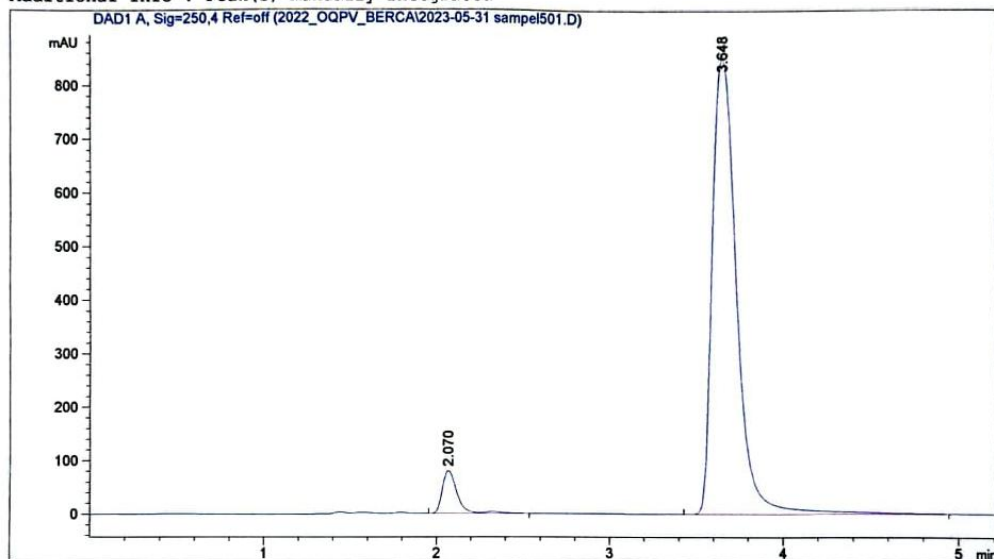
Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.069	BV R	0.0904	464.23761	76.33677	4.7081
2	3.637	BB	0.1528	9396.19824	954.95856	95.2919

Totals : 9860.43585 1031.29533

Sample Info : met:air=30:70/adisistandart

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report
=====

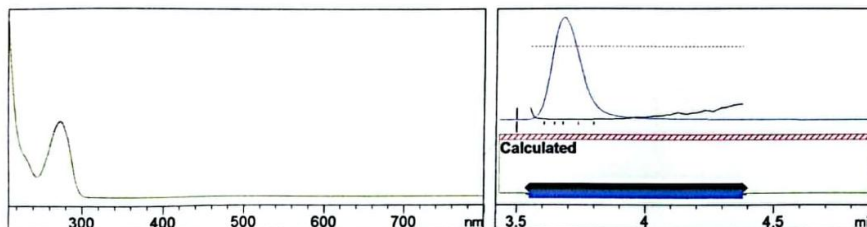
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.070	BV R	0.0907	483.09973	79.51094	5.5244
2	3.648	BB	0.1513	8261.71777	850.82690	94.4756

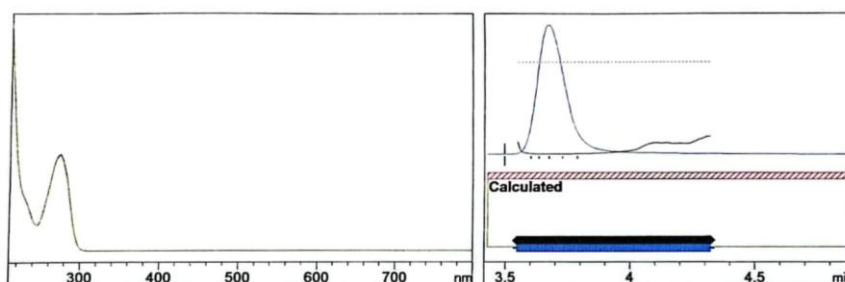
Totals : 8744.81750 930.33784

- **Purity factor**



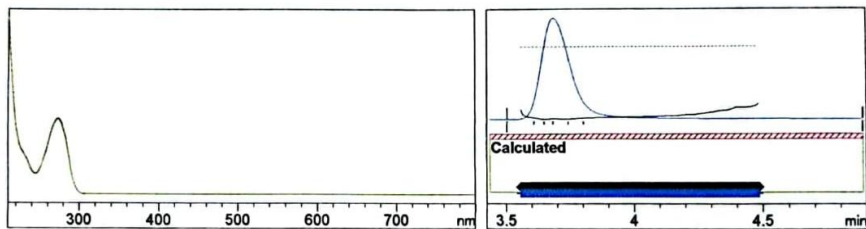
-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 999.620 (125 of 125 spectra are within the calculated threshold limit.)
 Threshold : 0.000 (Calculated with 125 of 125 spectra)
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (3.499 / 4.886)
 Spectra : 5 (Selection automatic, 5)
 Noise Threshold: 480.511 (10 spectra, St.Dev 68.9895 + 3 * 137.1739)
 Warning : Spectral absorbances > 1000 mAU (see help for more information)
 Warning : Calculated Noise Level > 1.00 (see information in threshold calculation)



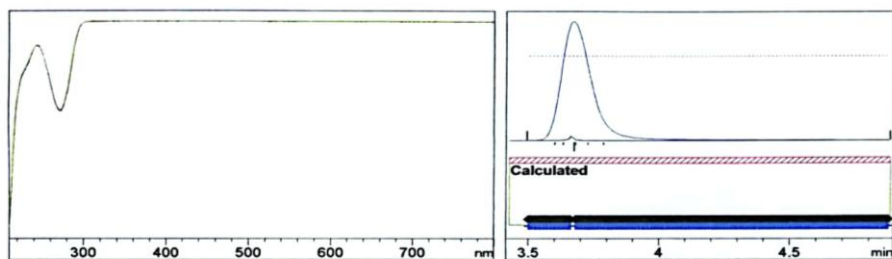
-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 999.645 (117 of 117 spectra are within the calculated threshold limit.)
 Threshold : 0.000 (Calculated with 117 of 117 spectra)
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (3.495 / 4.881)
 Spectra : 5 (Selection automatic, 5)
 Noise Threshold: 621.242 (12 spectra, St.Dev 80.4755 + 3 * 180.2555)
 Warning : Spectral absorbances > 1000 mAU (see help for more information)
 Warning : Calculated Noise Level > 1.00 (see information in threshold calculation)



-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

```
Purity factor : 999.683 (140 of 140 spectra are within the calculated threshold
limit.)
Threshold      : 0.000 (Calculated with 140 of 140 spectra)
Reference      : Peak start and end spectra (integrated) (3.505 / 4.885)
Spectra        : 5 (Selection automatic, 5)
Noise Threshold: 482.627 (10 spectra, St.Dev 69.0637 + 3 * 137.8546)
Warning        : Spectral absorbances > 1000 mAU (see help for more information)
Warning        : Calculated Noise Level > 1.00 (see information in threshold
calculation)
```



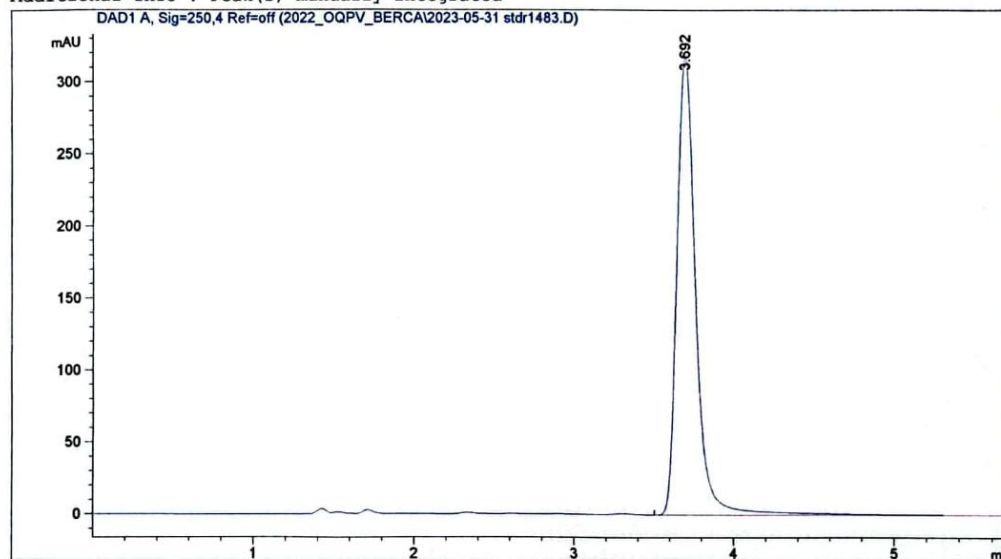
-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

```
Purity factor : 999.993 (205 of 205 spectra are within the calculated threshold
limit.)
Threshold      : 0.000 (Calculated with 205 of 205 spectra)
Reference      : Manual selected (3.675)
Spectra        : 5 (Selection automatic, 5)
Noise Threshold: 621.242 (12 spectra, St.Dev 80.4755 + 3 * 180.2555)
Warning        : Calculated Noise Level > 1.00 (see information in threshold
calculation)
```


- Linieritas, LOD dan LOQ

Sample Info : met:air=30:70/Linieritas

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

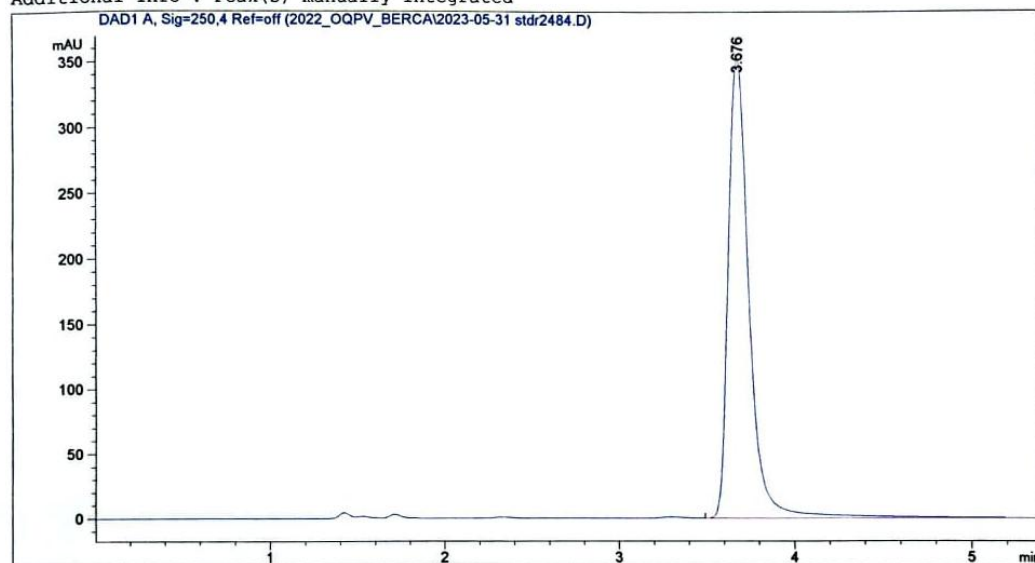
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution	ivity
3.692	-	2637.81079	317.53754	0.63	0.1208	5180	-	-	-

Sample Info : met:air=30:70/Linieritas

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report with Performance
=====

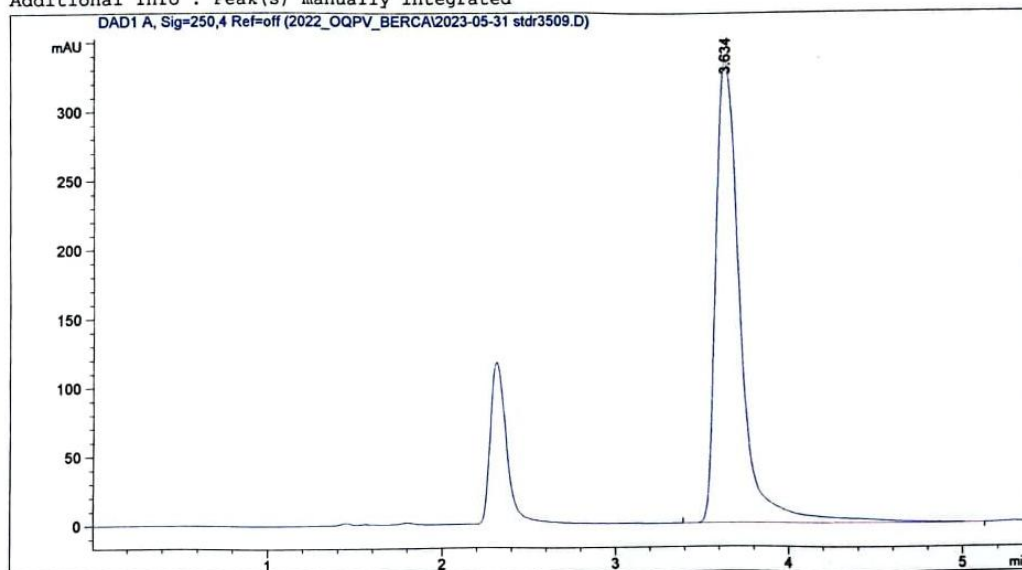
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
3.676	-	2929.76904	352.20471	0.63	0.1212	5099	-	-

Sample Info : met:air=30:70/Linieritas

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report with Performance
=====

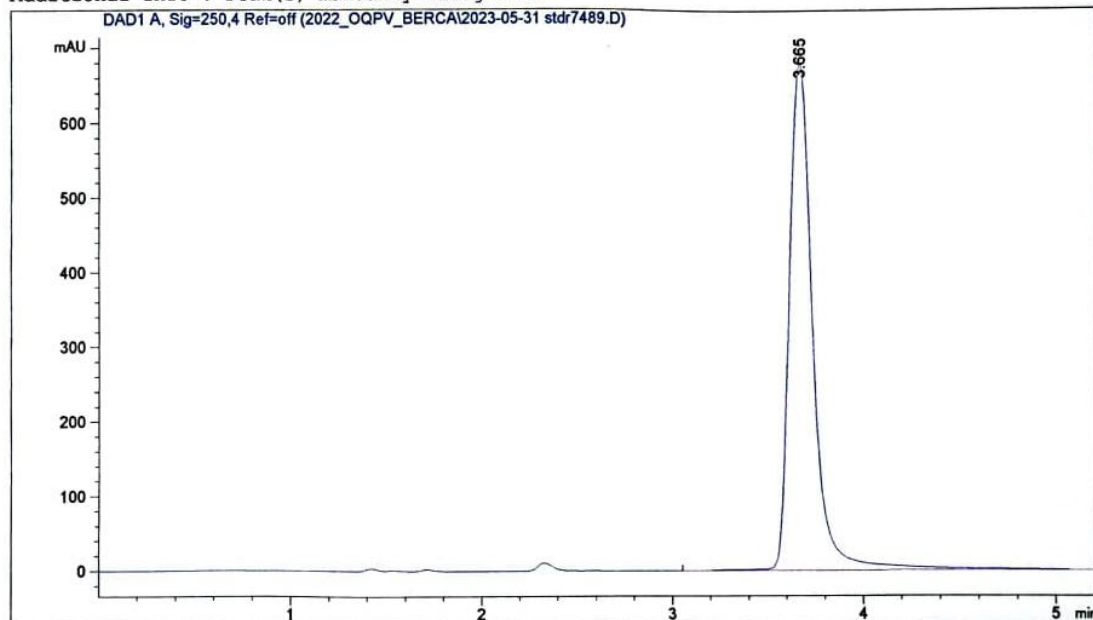
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
3.634	-	3338.09863	336.09464	0.49	0.1426	3595	-	-

Sample Info : met:air=30:70/Linieritas

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report with Performance
=====

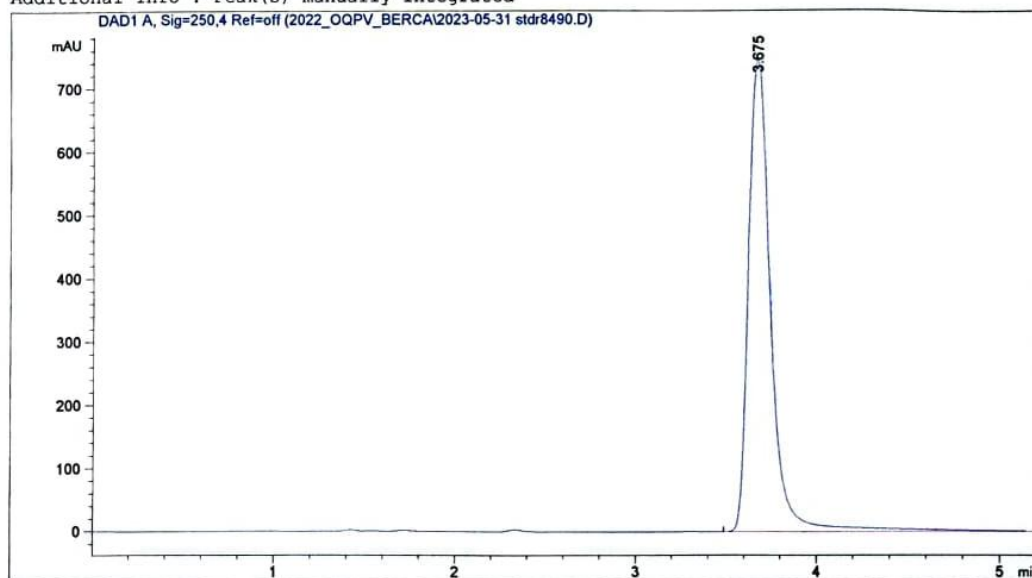
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
3.665	-	5853.24316	681.32782	0.63	0.1240	4844	-	-

Sample Info : met:air=30:70/Linieritas

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report with Performance
=====

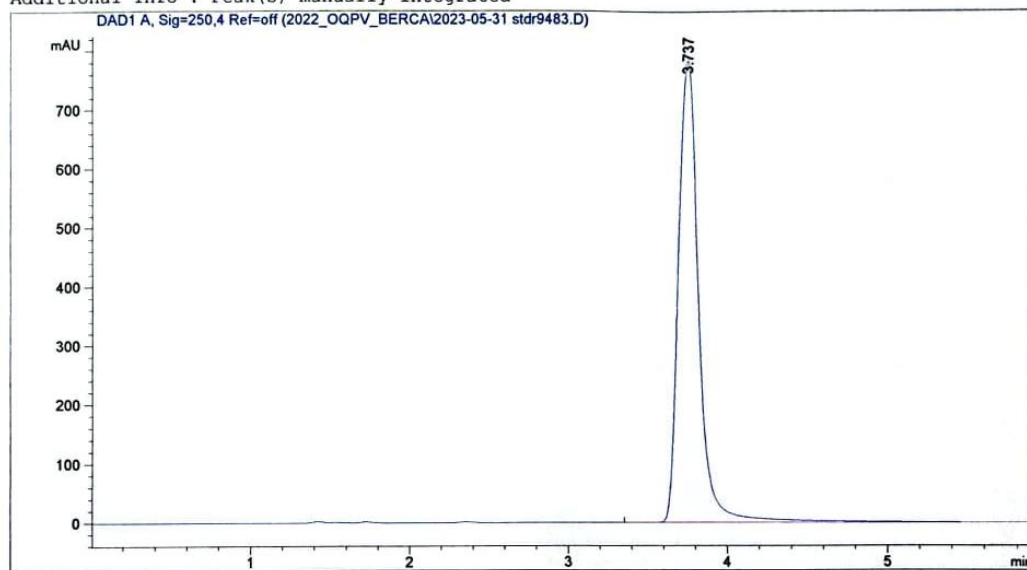
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
								ution ivity
3.675	-	6422.93457	745.14294	0.61	0.1249	4800	-	-

Sample Info : met:air=30:70/Linieritas

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report with Performance
=====

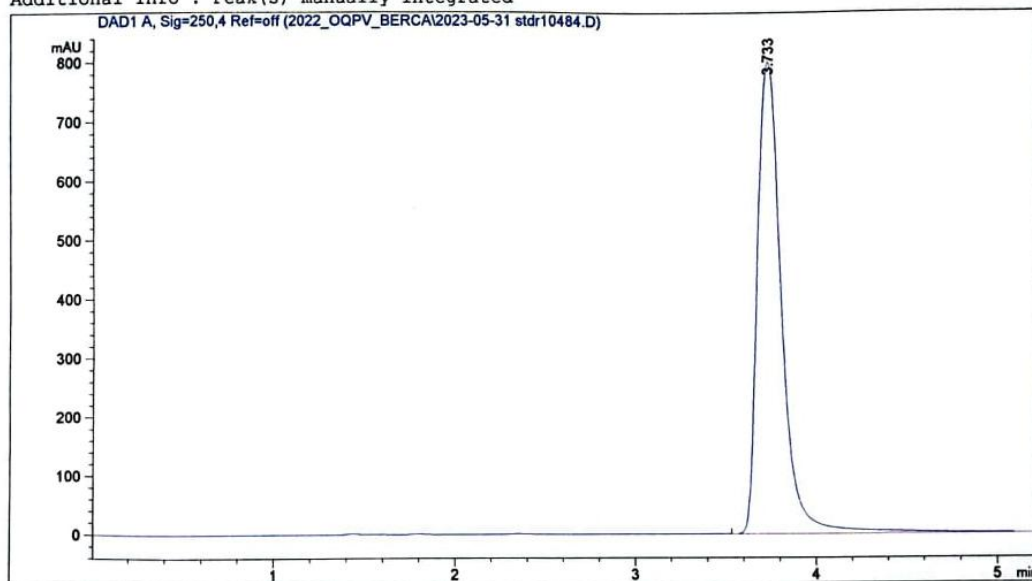
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution	ivity
3.737	-	6984.84131	786.40308	0.61	0.1296	4609	-	-	-

Sample Info : met:air=30:70/Linieritas

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report with Performance
=====

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

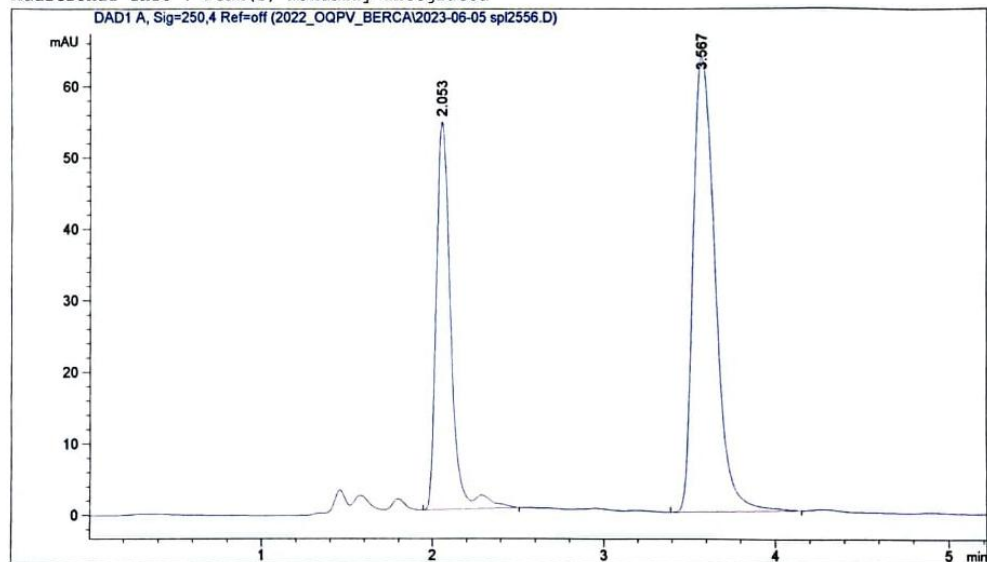
Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
3.733	-	7451.07324	800.88605	0.60	0.1373	4094	-	-

- Presisi

Sample Info : met:air=30:70/Presisi

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

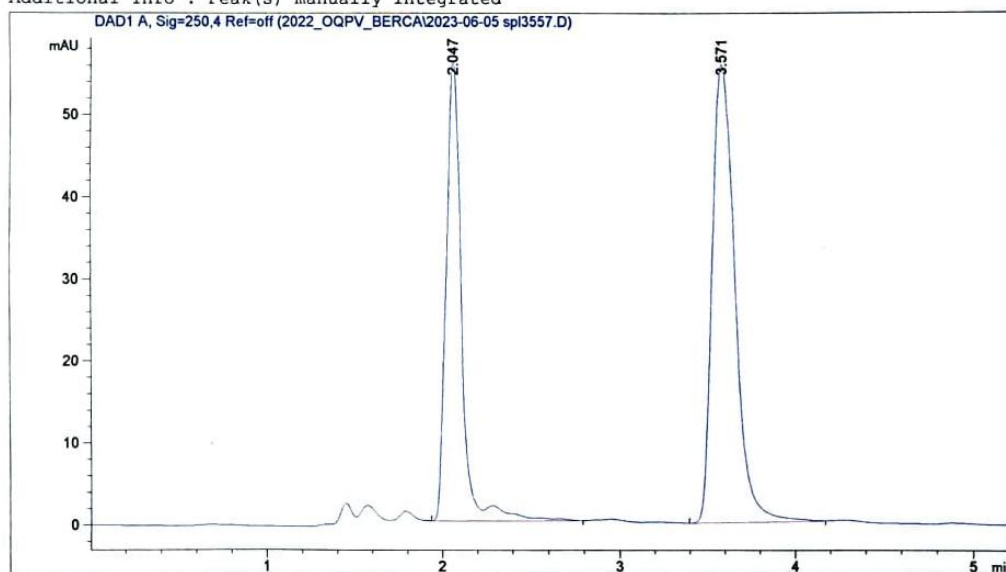
Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.053	BV R	0.0879	322.51492	54.44633	36.1529
2	3.567	BB	0.1423	569.57190	63.69550	63.8471

Totals : 892.08682 118.14183

Sample Info : met:air=30:70/Presisi

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

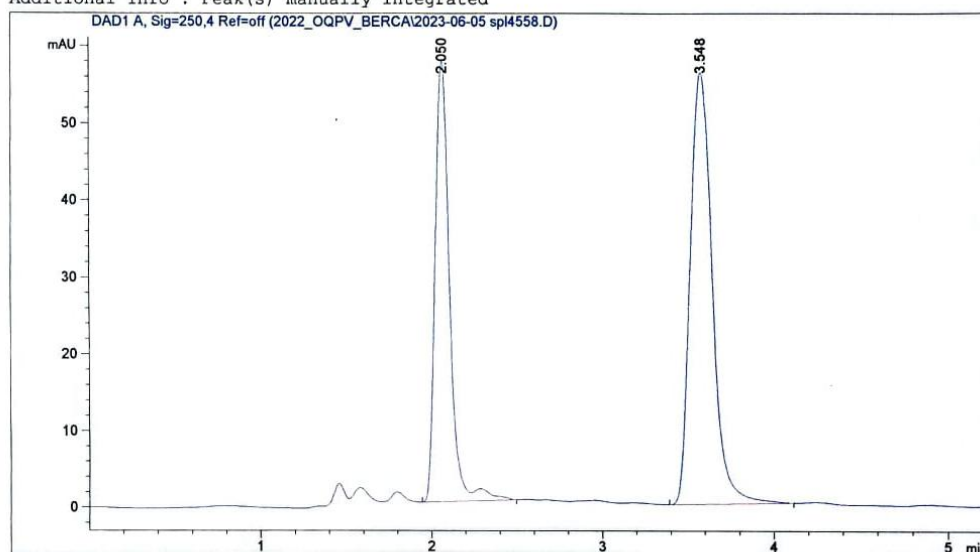
Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.047	BV R	0.0884	341.55484	56.07526	40.5104
2	3.571	BB	0.1449	501.57367	55.80959	59.4896

Totals : 843.12851 111.88484

Sample Info : met:air=30:70/Presisi

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

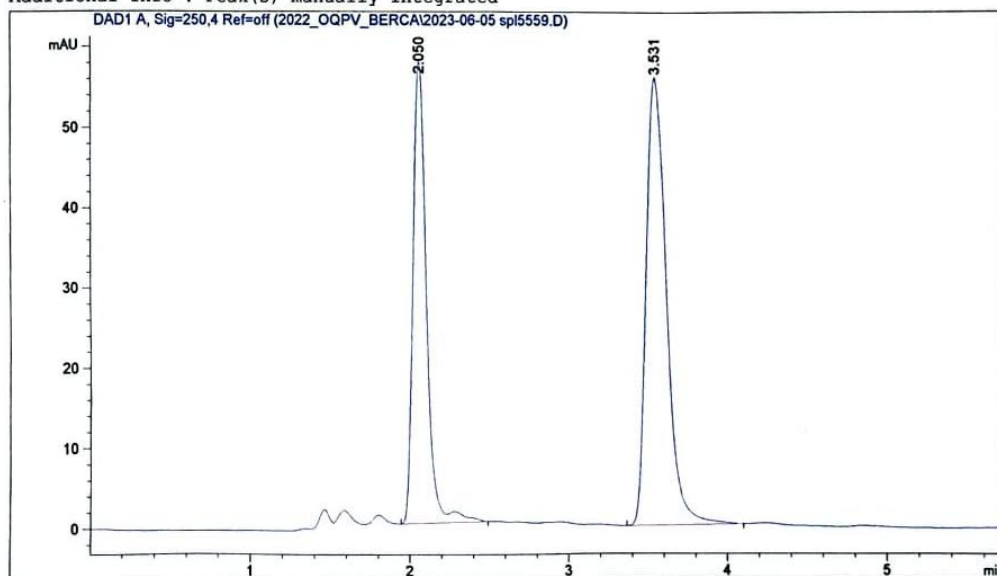
Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.050	BV R	0.0902	338.93051	57.45860	40.3080
2	3.548	BB	0.1422	501.92065	56.21645	59.6920

Totals : 840.85117 113.67505

Sample Info : met:air=30:70/Presisi

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

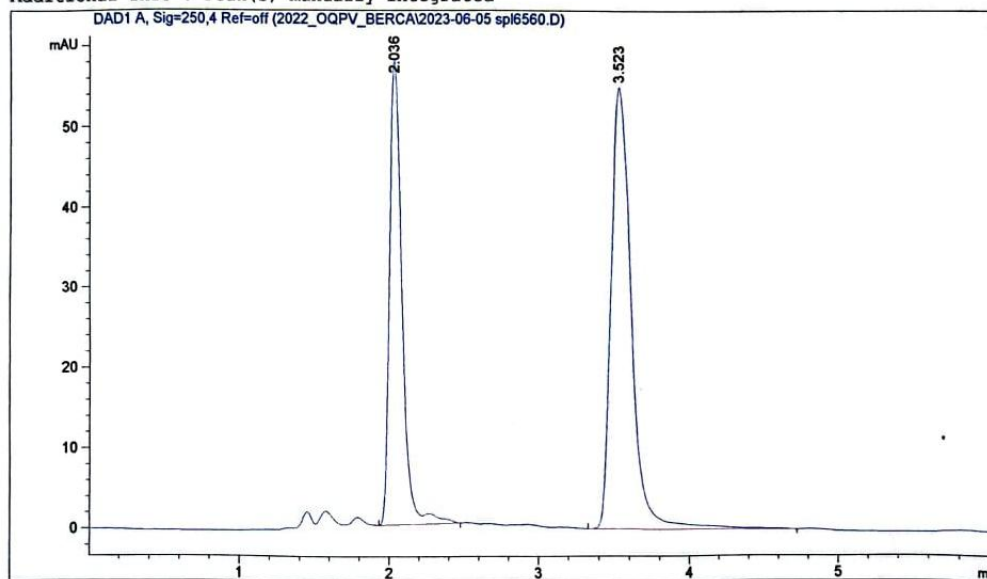
Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.050	BV R	0.0900	335.86829	57.52156	40.3176
2	3.531	BB	0.1396	497.18893	55.96825	59.6824

Totals : 833.05722 113.48981

Sample Info : met:air=30:70/Presisi

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.036	BV R	0.0878	335.60651	57.72854	39.6429
2	3.523	BB	0.1486	510.96686	54.87909	60.3571

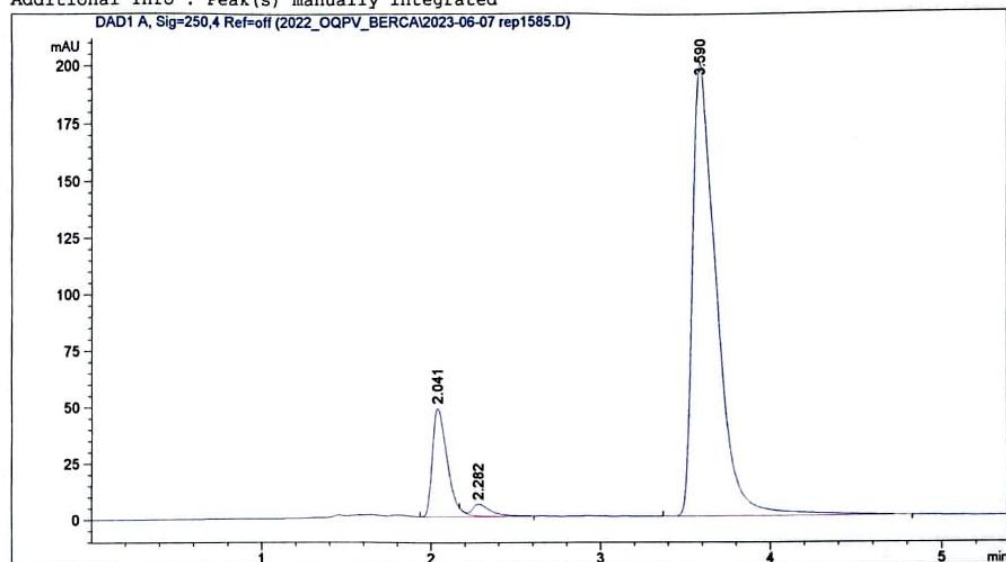
Totals : 846.57336 112.60762

- Akurasi

- Konsentrasi 30 %

Sample Info : met:air=30:70/Akurasiadisi30%

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report with Performance
=====

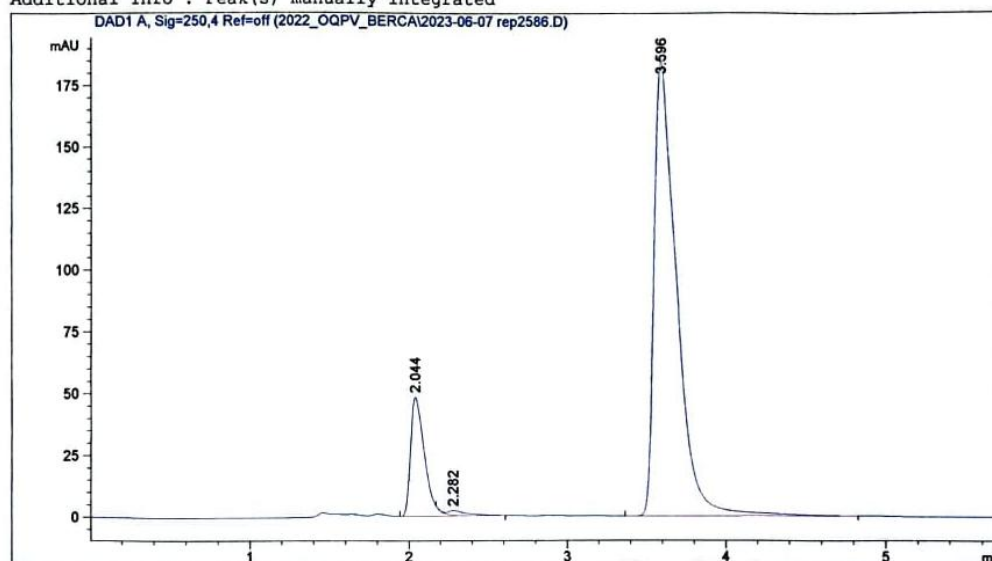
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
2.041	-	287.20126	46.97334	0.53	0.0950	2562	-	-
2.282	-	39.13935	5.26485	0.44	0.1078	2486	1.40	1.12
3.590	-	1971.56384	200.38948	0.41	0.1497	3185	5.97	1.57

Sample Info : met:air=30:70/Akurasiadisi30%

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report with Performance
=====

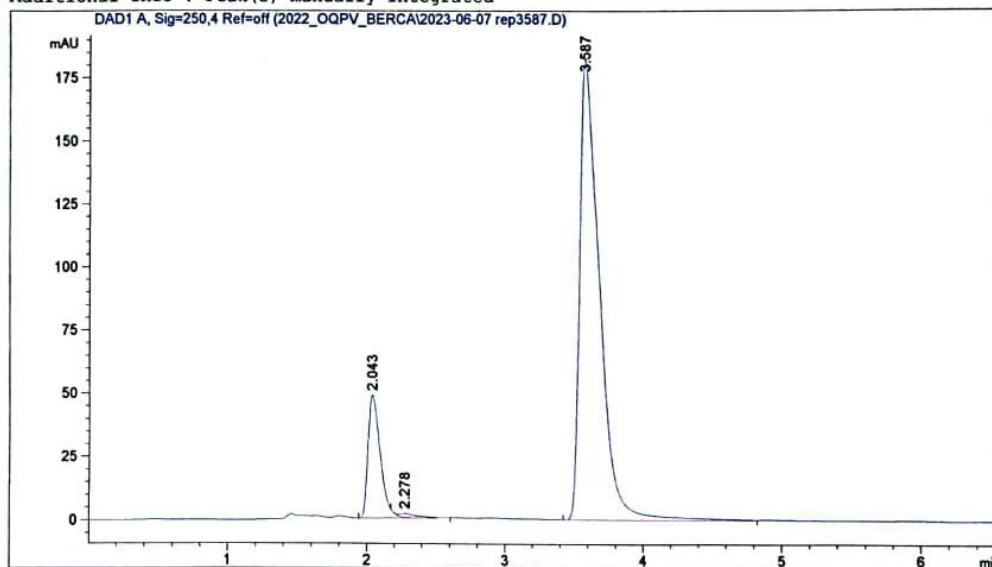
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
2.044	-	297.08472	48.28133	0.53	0.0950	2566	-	-
2.282	-	17.26873	1.93672	0.35	0.1778	915	1.02	1.12
3.596	-	1823.06982	184.99464	0.40	0.1495	3207	4.72	1.58

Sample Info : met:air=30:70/Akurasiadis130%

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
Area Percent Report with Performance
=====

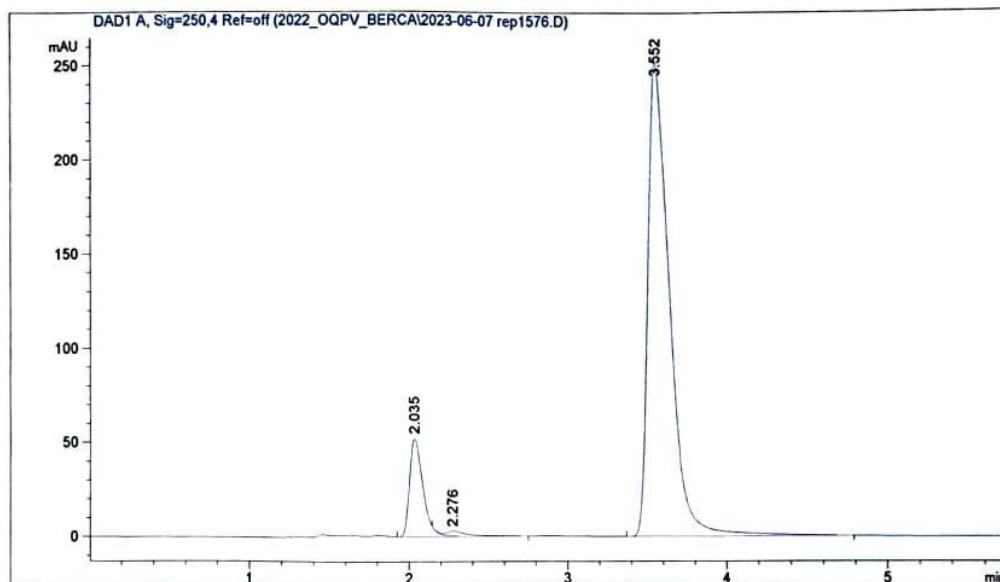
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
2.043	-	298.91174	48.33092	0.52	0.0964	2488	-	-
2.278	-	13.90030	1.49775	0.32	0.1656	1048	1.06	1.12
3.587	-	1800.86230	182.43253	0.40	0.1499	3179	4.88	1.57

- **Konsentrasi 45 %**

Sample Info : met:air=30:70/Akurasiadisi45%



=====
Area Percent Report with Performance
=====

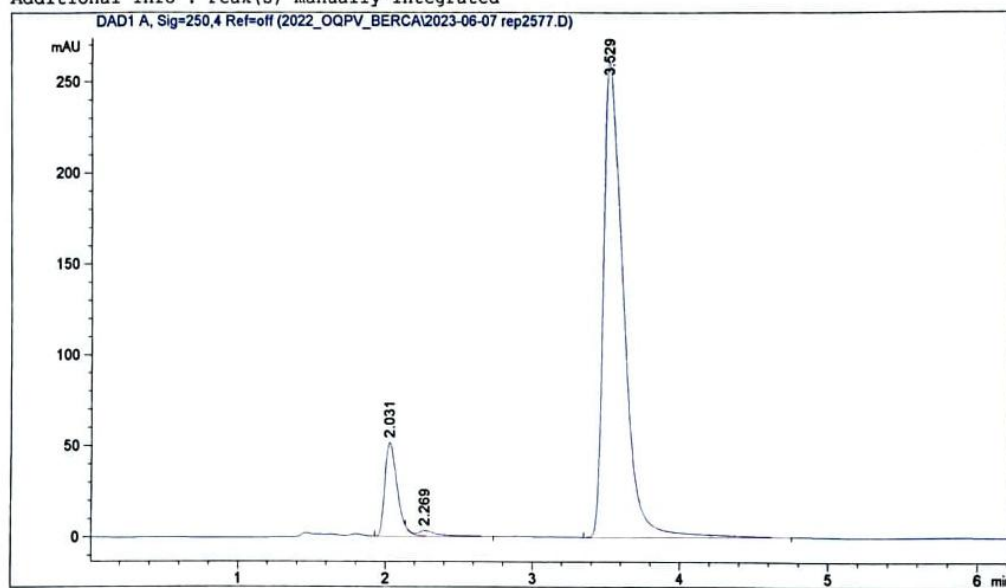
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
2.035	-	305.94385	51.94466	0.57	0.0909	2788	-	-
2.276	-	26.58368	2.72883	0.38	0.1227	1912	1.33	1.12
3.552	-	2377.11816	251.82204	0.44	0.1425	3444	5.65	1.56

Sample Info : met:air=30:70/Akurasiadisi45%

Additional Info : Peak(s) manually integrated



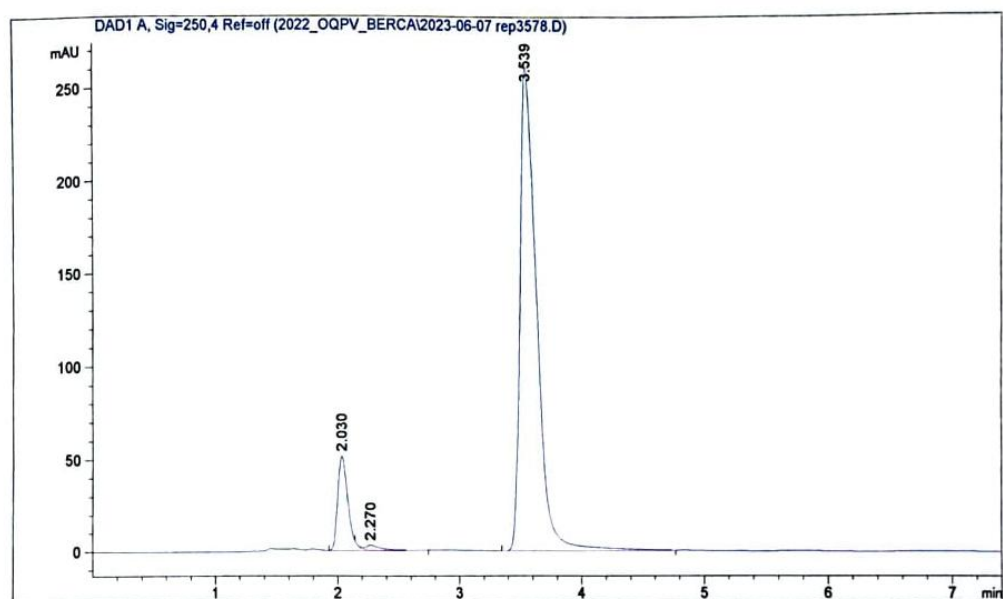
=====
Area Percent Report with Performance
=====

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
2.031	-	301.86588	51.46107	0.58	0.0919	2706	-	-
2.269	-	26.69666	2.99907	0.41	0.1160	2123	1.35	1.12
3.529	-	2455.93945	260.30148	0.44	0.1426	3397	5.72	1.56

Sample Info : met:air=30:70/Akurasiadisi45%



=====
Area Percent Report with Performance
=====

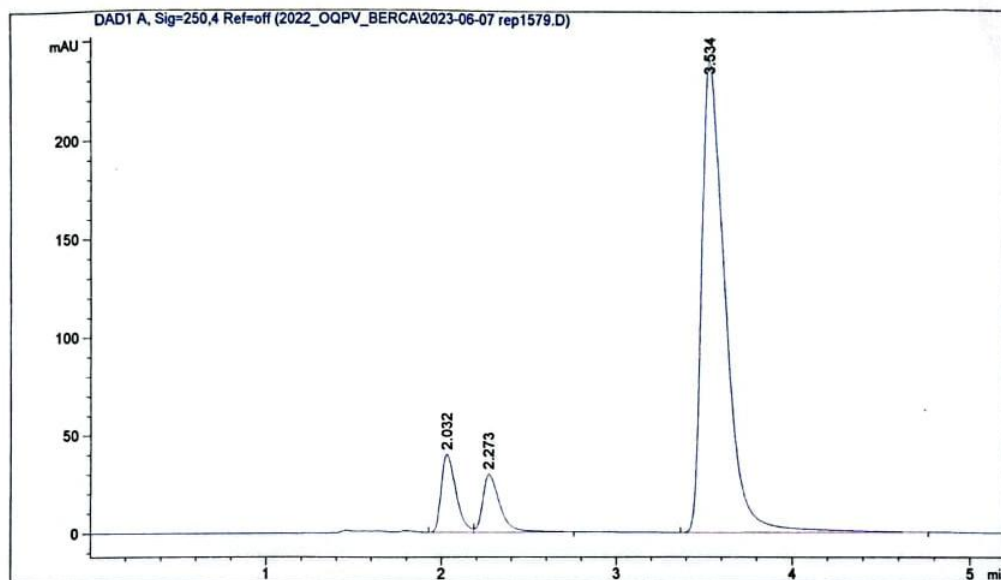
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
2.030	-	300.49051	51.10660	0.58	0.0911	2760	-	-
2.270	-	25.52296	2.69393	0.38	0.1160	2116	1.36	1.12
3.539	-	2451.33618	261.07617	0.44	0.1414	3474	5.79	1.56

- **Konsentrasi 60 %**

Sample Info : met:air=30:70/Akurasiadisi60%



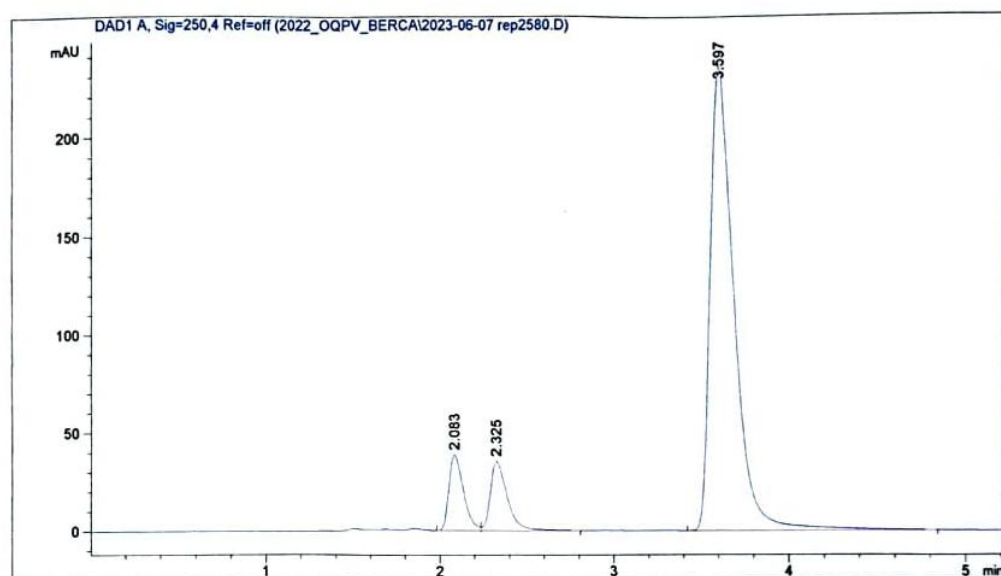
=====
Area Percent Report with Performance
=====

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
2.032	-	229.82222	39.56690	0.58	0.0907	2785	-	-
2.273	-	198.46524	29.41185	0.53	0.1010	2809	1.48	1.12
3.534	-	2244.46655	239.80930	0.44	0.1409	3486	6.12	1.55

Sample Info : met:air=30:70/Akurasiadisi60%



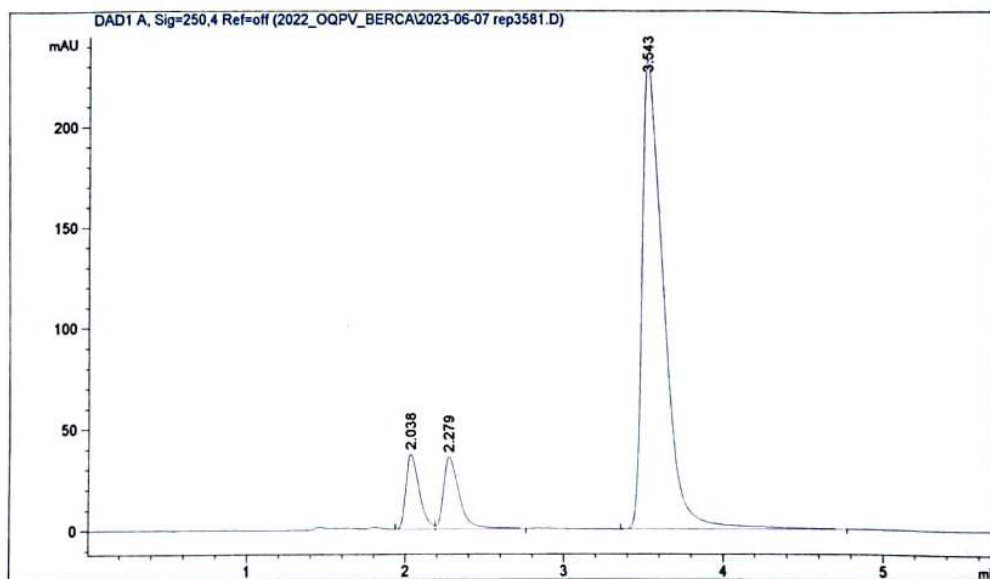
=====
Area Percent Report with Performance
=====

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
2.083	-	217.94127	37.68616	0.58	0.0907	2923	-	-
2.325	-	231.78671	34.54937	0.53	0.1007	2960	1.49	1.12
3.597	-	2220.27710	235.71245	0.44	0.1418	3559	6.16	1.55

Sample Info : met:air=30:70/Akurasiadisi60%



=====
Area Percent Report with Performance
=====

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

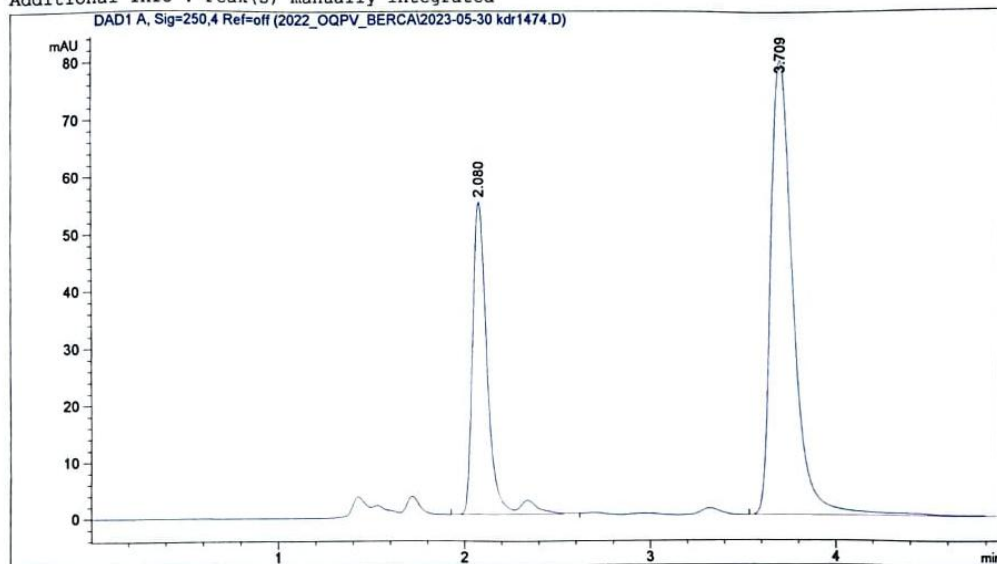
RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
2.038	-	213.55527	36.66793	0.58	0.0908	2790	-	-
2.279	-	236.76033	35.15728	0.53	0.1000	2876	1.49	1.12
3.543	-	2187.26343	233.19380	0.44	0.1413	3488	6.15	1.55

Lampiran 17 Kromatogram penetapan kadar alkaloid

- Replikasi 1

Sample Info : met:air=30:70

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

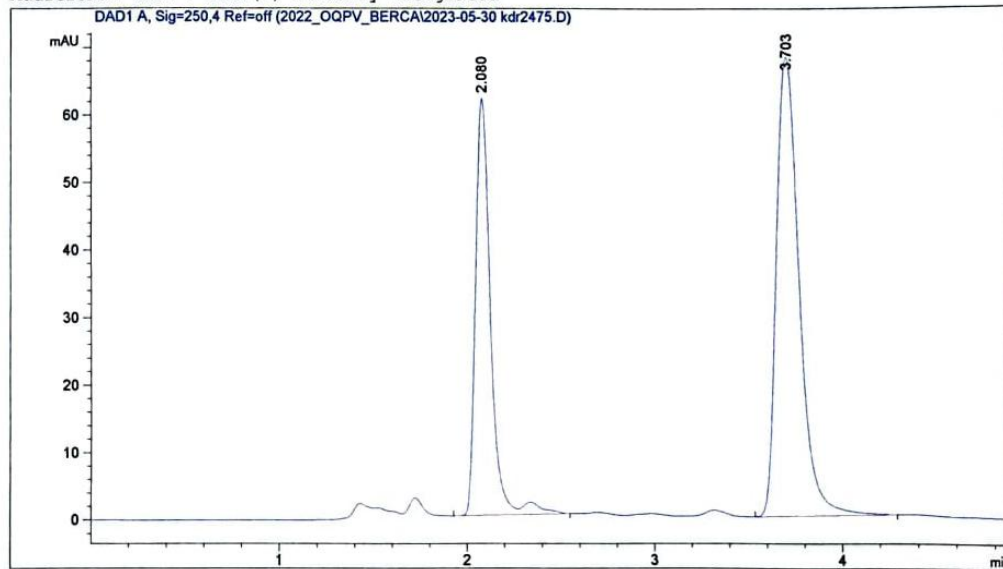
Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
2.080	-	302.96445	54.72955	0.72	0.0800	3754	-	-
3.709	-	671.20551	80.04361	0.62	0.1242	4943	9.37	1.78

- Replikasi 2

Sample Info : met:air=30:70

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

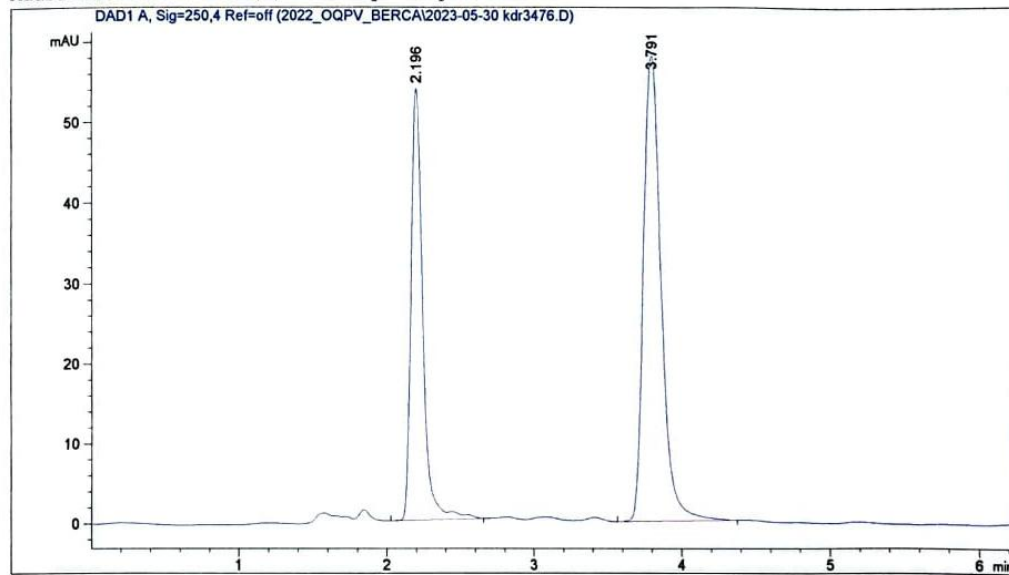
Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
2.080	-	345.56763	61.98586	0.72	0.0823	3548	-	-
3.703	-	574.42242	68.18348	0.64	0.1291	4553	9.02	1.78

- Replikasi 3

Sample Info : met:air=30:70

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=250,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
2.196	-	297.81985	53.82076	0.65	0.0813	4030	-	-
3.791	-	486.77612	58.05420	0.64	0.1274	4916	8.98	1.73

CURRICULUM VITAE



DATA PRIBADI

Nama : Sindi Anggraiyani
Tempat, Tanggal Lahir : Kedaton, 08 Juli 2001
Jenis Kelamin : Perempuan
Kewarganegaraan : Indonesia
Agama : Islam
Status : Belum Kawin
Alamat : Jln. Puyang Uban, Desa Kedaton, Kec. Kedaton
Peninjauan Raya, Kab. Ogan Komering Ulu,
Kota Baturaja, Sumatra Selatan
No. Hp : -
Email : 19040129@stikesdrsoebandi.ac.id

DATA PENDIDIKAN

Tahun 2007 : TK AISYIYAH BUSTANUL ATHFAL
Tahun 2008 – 2013 : SD NEGERI 152 OKU
Tahun 2014 – 2016 : SMP NEGERI 15 OKU
Tahun 2017 – 2019 : SMA NEGERI 7 OKU
Tahun 2019 – Sekarang : Universitas dr. Soebandi Jember

PENGALAMAN ORGANISASI

Tahun 2017 – 2018	: Wakil Ketua PRAMUKA SMA N 7 OKU
Tahun 2017 – 2018	: Pasukan Inti PASKIBRAKA SMA N 7 OKU
Tahun 2018 – 2019	: Anggota Osis SMA N 7 OKU
Tahun 2018 – 2019	: Ketua PMR SMA N 7 OKU
Tahun 2020 – 2021	: Bendahara 2 HIMAFU UDS
Tahun 2021 – 2022	: Bendahara 1 HIMAFU UDS