

**VALIDASI METODE DAN PENENTUAN KADAR
ALKALOID TOTAL FRAKSI ETIL ASETAT DAUN
SIRSAK (*Annona muricata L.*). SECARA
SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS DI DESA KEMIRI
KABUPATEN JEMBER**

SKRIPSI



Oleh :

Ayu Dwi Wardani

NIM. 17040006

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

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)



Oleh :

Ayu Dwi Wardani

NIM. 17040006

**PROGRAM STUDI PROGRAM SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
2021**

LEMBAR PERSETUJUAN

Hasil penelitian ini telah diperiksa oleh pembimbing dan telah disetujui
untuk mengikuti seminar hasil pada Program Studi Program Sarjana
Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember

Jember, 06 Agustus 2021

Pembimbing I



Dr. apt. Ayik Rosita Puspawingtyas, M.Farm
NIDN. 0001028102

Pembimbing II



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm
NIDN. 0703068003

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul (*Validasi Metode Dan Penentuan Kadar Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat (Annona muricata L.). Secara Spektrofotometri UV-vis Di Desa Kemiri Kabupaten Jember*) telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada :

hari : Senin
tanggal : 09 Agustus 2021
tempat : Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi

Tim Penguji
Ketua,

Gumiarti, S.ST., M.PH
NIDN. 4005076201

Penguji II,

Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas., M.Farm
NIDN. 0001028102

Penguji III,

apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm
NIDN. 0703068903



Hella Meldy Fursina, S.Kep.,Ns.,M.Kep
NIDN. 0706109104

HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT yang senantiasa memberi tuntunan, petunjuk, rahmat, hidayah dan limpahan kasih-NYA sehingga skripsi ini dapat terselesaikan, serta junjungan besar Nabi Muhammad SAW sebagai panutan hidup;
2. Ayahanda Jaelani dan Ibu Hamida terkasih yang senantiasa memberi kasih sayang, motivasi, nasehat, dan doa yang mengiringi setiap langkah keberhasilan penulis;
3. Seluruh keluarga besar yang telah memberi motivasi dan doa;
4. Guru-guru dari TK Rengganis, MI Bustanul ulum, MTS Bustanul ulum dan SMA Plus Al-Hasan, serta segenap dosen pengajar prodi Farmasi Universitas dr. Soebandi yang telah membimbing dan memberikan ilmu yang sangat berharga;
5. Almamater tercinta Prodi Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember.

LEMBAR ORIGINALITAS

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ayu Dwi Wardani

NIM : 17040006

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul "*Validasi metode dan penentuan kadar alkaloid total fraksi etil asetat daun sirsak (Annona muricata L.). secara spektrofotometri UV- Vis di desa Kemiri Kabupaten Jember*" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari ini tidak benar.

Jember, 09 Agustus 2021

Yang menyatakan,



Ayu Dwi Wardani

NIM. 17040006

SKRIPSI

**Validasi Metode Dan Penentuan Kadar Alkaloid Total
Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak (*Annona muricata L.*).
Secara Spektrofotometri UV-Vis Di Desa Kemiri
Kabupaten Jember**

oleh :

Ayu Dwi Wardani
NIM. 17040006

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm
Dosen Pembimbing Anggota : apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm

ABSTRAK

Wardani, Ayu Dwi,* Puspaningtyas, Ayik Rosita,** Setyaningrum, Lindawati,***.
Validasi Metode dan Penentuan Kadar Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat (*Annona muricata L.*). Secara Spektrofotometri UV-vis Di Desa Kemiri Kabupaten Jember. Skripsi. Program Studi Ilmu Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember.

Alkaloid merupakan salah satu metabolit sekunder yang terkandung dalam daun sirsak (*Annona muricata L.*). yang diperoleh dari desa Kemiri Kabupaten Jember. Validasi metode penentuan kandungan alkaloid total dalam daun sirsak perlu dilakukan agar didapatkan hasil yang valid dan dapat dipertanggung jawabkan secara ilmiah. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode analisis untuk menentukan kadar alkaloid total yang terdapat dalam fraksi etil asetat daun sirsak secara spektrofotometri UV-vis. Penelitian ini menggunakan metode ekperimental kuantitatif, data validasi dikumpulkan dengan mengamati beberapa parameter yaitu spesifisitas, linieritas, *limit of detection* (LOD), *limit of quantitation* (LOQ), akurasi dan presisi. Hasil penelitian menunjukkan spesifisitas yang baik, uji linieritas dengan nilai korelasi (r) = 0,99986 dan $V_{x_0} < 2$, *limit of detection* (LOD) = 0,0932 ppm dan *limit of quantitation* (LOQ) = 0,3106 ppm, hasil uji akurasi dengan konsentrasi 8 ppm; 10 ppm; dan 12 ppm memiliki nilai %Recovery secara berturut-turut 100,4797%; 100,9171%; dan 100,6430%, sedangkan hasil uji presisi dengan konsentrasi 8 ppm nilai SD = 0,0874 dan %RSD = 0,2627%, konsentrasi 10 ppm nilai SD = 0,0792 dan %RSD = 0,2239%, dan konsentrasi 12 ppm nilai SD = 0,1083 dan %RSD = 0,2899%. Rata –rata kadar alkaloid total fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*) adalah 4,1859% b/b. Berdasarkan hasil tersebut spektrofotometri UV-vis dapat digunakan sebagai metode dalam penetapan kadar alkaloid total dalam fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek farmakologi alkaloid pada daun sirsak (*Annona muricata L.*). dalam dunia pengobatan.

Kata kunci : Alkaloid total, Validasi metode, Spektrofotometri UV-Vis

*peneliti

**pembimbing 1

***pembimbing 2

ABSTRACT

Wardani, Ayu Dwi,* Puspaningtyas, Ayik Rosita,** Setyaningrum, Lindawati,***. Validation of Method and Determination of Total Alkaloid Content of Fraction Ethyl Acetate (*Annona muricata L.*) by Spectrophotometry UV-Vis in Jember. Undergraduate Thesis. Study Program of Pharmacy, University Dr. Soebandi, Jember.

Alkaloid is one of the secondary metabolites which is contained in soursop leaves (*Annona muricata L.*), which is obtained from Kemiri village, Jember. validation of determining method of total alkaloid in soursoap leaves was carried out in order to obtained the validated result and it can be accounted scientifically. This study aims to validate the analysis method in order to determine the total alkaloid content of acetate ethyl fraction of soursop leaves by Spectrophotometry UV-Vis. This study used quantitative experimental method, validation data was collect by observed some parameters, namely specificity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy, and precision. The results showed good specificity, linearity test with the value of correlation coefficient (r) = 0,99986 and $v_{x_0} < 2$, limit of detection (LOD) was 0,0932 ppm, and limit of quantification (LOQ) was 0,3106, while, the result of the precision test at 8 ppm concentration had SD value = 0,0874 and %RSD = 0,2627%, at 10 ppm concentration had SD value = 0,0792 and %RSD = 0,2239%, and at 12 ppm concentration had a SD value = 0,1083 and %RSD = 0,2899%. The average content of total alkaloids of the acetate ethyl fraction of soursop leaves (*Annona muricata L.*) was 4,1859% w/w. Based on the result mentioned, the Spectrophotometry UV-Vis could be used as a method for determination of the total alkaloids content of the acetate ethyl fraction of soursop leaves (*Annona muricata L.*). So that, it need to do the advanced research about the effect of pharmacology of alkaloids in soursop leaves (*Annona muricata L.*) in medicinal treatment.

Keywords : Total alkaloids, method validation, Spectrophotometry UV-Vis

*researcher

**advisor 1

***advisor 2

KATA PENGANTAR

Puji serta syukur kehadiran Tuhan Yang Esa, sebab berkat rahmat serta karunia-Nya semata sehingga penulis sanggup menuntaskan penyusunan skripsi dengan judul “Validasi Metode Dan Penentuan Kadar Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak (*Annona muricata L.*). Secara Spektrofotometri UV- Vis Di Desa Kemiri Kabupaten Jember “.

Penyusunan skripsi ini adalah untuk memenuhi salah satu persyaratan menyelesaikan pendidikan Program Studi Ilmu Farmasi. Penyusunannya dapat terlaksana dengan baik berkat dukungan dari banyak pihak. Untuk itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Drs. Said Mardijanto, S.Kep., Ns., MM selaku Ketua Universitas dr. Soebandi;
2. Ibu Hella Meldy Tursina, S.Kep.,Ns.,M.Kep selaku dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi;
3. Ibu apt. Dhina Ayu Susanti, S.Farm.,M.Kes. selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi;
4. Ibu Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm selaku dosen pembimbing utama dan Ibu apt. Lindawati Setyaningrum,M.Farm selaku pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, perhatian,

dan dengan sabar membimbing penulis untuk menyelesaikan penelitian ini;

5. Ibu Gumiarti, S.ST., M.PH selaku dosen penguji yang banyak memberikan saran bermanfaat dalam penulisan skripsi ini;
6. Ibu apt. Wima Anggitasari., M.Sc selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing penulis selama penulis menjadi mahasiswa;
7. Segenap Dosen Prodi Farmasi Universitas dr. Soebandi yang telah memberikan ilmu dan berbagai pengalaman; staff dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama penulis menjadi mahasiswa prodi Farmasi;
8. Mbak Nanda Letitia Ivana., M.Si selaku teknisi Laboratorium Kimia Farmasi Universitas dr. Soebandi yang telah membantu penulis selama penelitian;
9. Orang tua tercinta Ayah Jaelani dan Ibu Hamida yang selalu membimbing, membiayai, mendoakan, dan memberikan motivasi dalam penyelesaian penelitian ini;
10. Adinda Fatin dan Faizatul L yang senantiasa membantu dalam menyelesaikan penelitian ini;
11. Muhammad Faelani yang senantiasa selalu mendukung dan mendoakan;
12. Sahabat terbaikku Dessy Yani Argarny, Evita Mahalia dan Nurul Istiqomah yang senantiasa mendampingi selama empat tahun ini, selalu memberikan saran dan masukan dan saling mendoakan;

13. Rekan-rekan Tim Kimia (Dyah Purwaningtyas, Khairina Dinda, Reza Diar M dan Nabila Hermawanti) yang saling mendoakan dan saling bekerja sama;
14. Rekan-rekan 17A Farmasi yang selalu memotivasi demi terselesaikannya penelitian ini;
15. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu. Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga kebaikan dan dukungan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan Tuhan Yang Maha Esa. Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Penulis menyadari skripsi ini tidak luput dari berbagai kekurangan. Penulis mengharapkan saran dan kritik demi kesempurnaan dan perbaikannya sehingga akhirnya skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi bidang pendidikan dan penerapan dilapangan serta bias dikembangkan lagi lebih lanjut.

Jember, 09 Agustus 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN JUDUL DALAM	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
LEMBAR PERSEMBAHAN	v
LEMBAR ORIGINALITAS	vi
LEMBAR BIMBINGAN	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Tinjauan tumbuhan sirsak.....	9

2.1.1	Klasifikasi tumbuhan.....	9
2.1.2	Morfologi tumbuhan sirsak	9
2.1.3	Kandungan kimia daun sirsak.....	10
2.1.4	Khasiat daun sirsak.....	11
2.2	Ekstraksi	11
1.2.1	Definisi ekstraksi	11
1.2.2	Tujuan ekstraksi.....	12
1.2.3	Metode ekstraksi	12
2.3	Alkaloid	17
2.4	Penetapan kadar alkaloid total	20
2.5	Kafein	21
2.6	Spektrofotometri UV-Vis	23
2.6.1	Pengertian spektrofotometri	23
2.6.2	Prinsip kerja spektrofotometri	24
2.6.3	Hukum <i>lambeert beer</i>	28
2.6.4	Warna komplementer.....	30
2.6.5	Spektrofotometri visible	31
2.7	Validasi metode analisis	32
2.7.1	Spesifisitas	33
2.7.2	Linieritas	35
2.7.3	<i>Limit of detection</i> (LOD)	36
2.7.4	<i>Limit of quantitation</i> (LOQ)	37
2.7.5	Presisi.....	38

2.7.6 Akurasi.....	39
2.7.7 Kisaran (<i>Range</i>).....	41
2.7.8 <i>Ruggedness</i>	41
2.7.9 <i>Robustness</i>	42
2.7.10 Stabilitas	43
2.7.11 Uji kesesuaian sistem	44
BAB III. KERANGKA KONSEP.....	47
3.1 Kerangka konsep	47
3.2 Hipotesis penelitian	48
BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN.....	49
4.1 Desain penelitian	49
4.2 Populasi dan sampel	49
4.2.1 Populasi	49
4.2.2 Sampel	50
4.3 Tempat dan waktu penelitian.....	50
4.4 Definisi operasional.....	50
4.5 Pengumpulan dan analisa data.....	52
4.5.1 Teknik pengolahan	52
4.5.2 Aplikasi metode analisis pada penetapan kadar alkaloid	59
BAB V. HASIL PENELITIAN	60
5.1 Data umum penelitian	60
5.2 Data khusus penelitian.....	63

BAB VI. PEMBAHASAN.....	69
6.1 Validasi metode analisis.....	69
6.6.1 Spesifisitas	69
6.6.2 Linieritas	70
6.6.3 Lod & Loq.....	72
6.6.4 Akurasi	73
6.6.5 Presisi	74
6.2 Penetapan kadar alkaloid total	75
BAB VII. PENUTUP.....	79
7.1 Kesimpulan	79
7.2 Saran	80
DAFTAR PUSTAKA.....	81
LAMPIRAN-LAMPIRAN	88

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Spektrum cahaya tampak dan warna-warna komplementer	31
Tabel 2. Persyaratan presisi.....	39
Tabel 3. Persyaratan persen recovery	41
Tabel 4. Definisi operasional	51
Tabel 5. Penentuan konsentrasi optimum	62
Tabel 6. Penentuan LOD & LOQ	65
Tabel 7. Penentuan akurasi	66
Tabel 8. Penentuan presisi.....	67
Tabel 9. Penentuan kadar alkaloid total	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tanaman sirsak.....	9
Gambar 2. Struktur kafein.....	22
Gambar 3. Bagian instrument spektrofotometri.....	25
Gambar 4. Proses dispersi cahaya	26
Gambar 5. Kerangka konsep	47
Gambar 6. Panjang gelombang maksimum	60
Gambar 7. <i>Operating time</i>	61
Gambar 8. Spektra spesifisitas	63
Gambar 9. Kurva Linieritas.....	64
Gambar 10. Reaksi alkaloid dengan asam kuat.....	77
Gambar 11. Reaksi pembebasan amina dengan cara pembasaan	77

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat hasil determinasi tanaman	88
Lampiran 2. Rendemen Ekstrak Etanol 96% Dan Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak.....	89
Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan <i>Bromocresol Green</i> 10^{-4} dan Dapar Phospat pH 4,7	90
Lampiran 4. Pengenceran optimasi konsentrasi.....	91
Lampiran 5. Perhitungan Validasi Metode Analisis	92
Lampiran 6. Perhitungan Kadar Alkaloid Total.....	98
Lampiran 7. Jadwal Kegiatan Penelitian.....	99

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sudah lama memahami serta memakai tumbuhan berkhasiat obat sebagai salah satu upaya untuk menanggulangi permasalahan kesehatan. Pengetahuan terkait tumbuhan berkhasiat obat berdasar pada pengalaman serta keterampilan yang secara turun temurun sudah diwariskan dari satu generasi ke generasi selanjutnya (Bobsaid, 2018).

Salah satu tanaman obat yang ada di Indonesia adalah *Annona muricata* L. yang biasa dikenal dengan sirsak. Tumbuhan ini memiliki daun tebal yang berkilau sisi atas, daunnya berbentuk bulat telur, lonjong, dan tajam untuk berbagai tingkat, buah sirsak berwarna hijau tua, berduri, dan bulat telur dengan daging buah yang berair, asam, keputihan, dan aromatik. Daun sirsak sangat bermanfaat untuk pengobatan kanker (Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 2016). Daun sirsak juga berkhasiat untuk penyakit lain seperti; tumor, demam, hipertensi, sakit pinggang dan kejang-kejang (Mardiana & Ratnasari, 2012). Daun sirsak mengandung minyak atsiri, *sineol* 50-65 %, *α -pinen*, *limonene* dan *dipenten* (Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 2016).

Daun sirsak memiliki senyawa-senyawa metabolit sekunder. Untuk menganalisis senyawa-senyawa metabolit sekunder tersebut perlu dilakukan skrining fitokimia. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan

oleh *Usunobun, et al.*, 2014 diketahui komposisi proksimat dan analisis fitokimia yang dilakukan pada daun sirsak menggunakan metode ekstraksi dan metode skrining fitokimia menggunakan pelarut etanol. Fitokimia yang terdeteksi dalam ekstrak etanol daun sirsak adalah flavonoid, alkaloid, jantung glikosida, tanin, triterpenoid, saponin dan gula pereduksi (*Usunobun et al.*, 2014). Ekstrak etanol daun sirsak mempunyai kandungan senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavanoid, terpenoid, saponin, steroid, serta tanin. (*Rahman, et al.*, 2017). Ekstrak etanol daun sirsak telah terbukti memiliki aktivitas antimikroba, anti-inflamasi, antiprotozoa, antioksidan, dan antitumor (*Wisdom et al.* 2014).

Salah satu metode yang digunakan untuk menarik senyawa alkaloid dalam daun sirsak adalah dengan ekstraksi. Ekstraksi merupakan aktivitas penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak bisa larut dengan memakai pelarut cair. Proses ekstraksi secara universal dapat dilakukan dengan metode maserasi, perkolasi, refluks, perlengkapan soxhlet, digesti, infusa serta dekok. Kualitas ekstrak dalam proses ekstraksi dipengaruhi oleh metode ekstraksi, waktu ekstraksi, temperatur, tipe pelarut, konsentrasi pelarut serta perbandingan bahan- pelarut (*Idah Rosidah et.al*, 2015).

Metode ekstraksi yang digunakan dalam ekstraksi bahan alam pada penelitian ini yaitu metode maserasi. Metode ekstraksi meserasi dapat dikerjakan dengan merendam sampel dalam pelarut organik. Prinsip dari metode ini adalah penghancuran dan perendaman bahan dalam pelarut.

Keuntungan dari metode ini tidak membutuhkan suhu tinggi sehingga cocok untuk mengekstrak bahan yang tidak tahan panas (komposisi volatil) (Meloan, 1999).

Penelitian ini juga menggunakan metode ekstraksi cair-cair secara asam basa dalam pengambilan senyawa alkaloid. Ekstraksi cair-cair merupakan pemisahan komponen kimia diantara dua fase pelarut (pelarut organik dan air) yang tidak saling bercampur, dimana sebagian komponen yang larut pada fase pertama dan ada sebagian yang akan larut pada fase kedua. Senyawa kimia akan terpisah ke dalam kedua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya dengan perbandingan konsentrasi yang tetap (Dinda, 2008).

Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder terbanyak yang memiliki atom nitrogen, yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan dan hewan. Sebagian besar senyawa alkaloid bersumber dari tumbuh-tumbuhan. Alkaloid dapat ditemukan pada berbagai bagian tanaman, seperti bunga, biji, daun, ranting, akar dan kulit batang (Hartati, 2010). Berdasarkan sudut pandang biologis, alkaloid adalah senyawa kimia biologis aktif dan berbentuk heterosiklik yang mengandung nitrogen dan sebagian dapat memiliki aktivitas farmakologi pada manusia dan hewan lainnya (Azzahra *et al.*, 2015). Alkaloid merupakan kelompok produk alami yang memiliki dampak besar dibidang kesehatan. Alkaloid mempunyai efek farmakologis yang kuat pada sistem mamalia serta organisme lain sehingga alkaloid mempunyai efek terapi yang penting.

Morfin, atropin, vincristine serta kuinin merupakan contoh alkaloid yang memiliki efek terapi seperti sebagai antimalaria dan kanker. Oleh karena itu penentuan kadar alkaloid sangat penting terkait dengan kualitas tanaman obat (Shamsa, 2008).

Metabolit sekunder yang terkandung dalam daun sirsak khususnya alkaloid umumnya akan meningkat apabila tanaman mengalami cekaman dari lingkungannya. Hal ini terjadi karena metabolit sekunder digunakan untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan tersebut (Pinem, 2007). Hal ini terbukti pada penelitian Tanamal *et al*, 2017 dimana pada penelitiannya membandingkan kandungan senyawa metabolit sekunder di Desa Kayu Putih (Dataran tinggi) dengan Desa Lathalati (Dataran rendah) dengan hasil analisis kandungan metabolit sekunder lebih tinggi di daerah dataran tinggi dibandingkan dataran rendah. Tinggi tempat disini berpengaruh terhadap temperatur udara dan intensitas cahaya. Temperatur dan intensitas cahaya akan semakin kecil dengan semakin tingginya tempat tumbuh (Sulistiyono *dalam* Nurnasari, 2010). Semakin tinggi suatu tempat, maka meningkatnya kelembapan. Ketinggian tempat juga mempengaruhi kandungan metabolit sekunder. Semakin tinggi suatu tempat maka semakin banyak kandungan metabolit sekunder (Fatchurrozaq *et al*, 2013). Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan pengambilan sampel di Desa Kemiri Kabupaten Jember yang memiliki ketinggian sekitar 450 sampai dengan 600 meter diatas permukaan laut (m dpl) (Sedy, 2015).

Adapun metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya senyawa alkaloid di dalam tanaman, diantaranya yaitu penentuan alkaloid menggunakan metode HPLC, fluorimetri, kromatografi ion, kolorimetri, kromatografi gas, dan kromatografi lapis tipis (A. M Levent, 2002; K. Masatoki and T. Hirokazu, 2000; C. Qing-Chun and J. Wang, 2001; X Qing-qin *et al.*, 2002; R. Pagliarussi *et al.*, 2002; Aksara, 2013). Identifikasi alkaloid menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis yang didasarkan pada reaksi alkaloid dengan *Bromocresol Green* (BCG) membentuk produk berwarna kuning (Ajanal *et al.*, 2012).

Metode analisis yang digunakan harus dipastikan telah sesuai dengan memenuhi kriteria kesesuaian metode pengujian, melalui validasi maka dapat membantu dalam memberikan jaminan bahwa proses analisis dapat diandalkan dan dapat dipertanggungjawabkan. Validasi metode analisis merupakan suatu teknik dalam menilaiparameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Dengan menggunakan standar atau sampel yang sudah diketahui (atau setidaknya telah dihitung sebelumnya) nilai parameter suatu produk validasi dapat memberikan informasi yang berguna mengenai akurasi, presisi, linearitas, dan karakteristik lainnya dari kinerja suatu metode yang sehari-hari digunakan pada sampel yang tidak diketahui. Sebagai catatan, validasi dapat digunakan untuk mengidentifikasi sumber variabilitas yang tidak diinginkan. (Torbeck L.D, 2007).

Validasi ulang perlu dilakukan walaupun data validasi sebelumnya sudah sesuai dengan kriteria penerimaan, karena metode yang dinyatakan valid pada kondisi tertentu belum tentu valid pada kondisi lain karena perlakuan pada pereaksi dan peralatan yang digunakan, analisis yang mengerjakan dan sebagainya. Parameter validasi yang dilakukan pada penelitian ini antara lain: linieritas, spesifisitas, presisi, akurasi, *Limit of detection (LOD)*, dan *Limit of Quantitation (LOQ)*.

Sejauh ini belum ada peneliti yang melakukan validasi dan penentuan kadar pada senyawa alkaloid total pada fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*). Oleh karena itu, peneliti ingin melakukan penelitian tentang validasi metode analisis dan penentuan kadar alkaloid total pada fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*) secara spektrofotometri UV-Vis di desa Kemiri kabupaten Jember.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka pada penelitian ini akan dilakukan validasi metode analisis alkaloid dari fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan menetapkan kadar alkaloid total tersebut secara Spektrofotometri UV-Vis.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka dapat dirumuskan masalah penelitian berikut:

1. Apakah metode analisis dalam penentuan kadar alkaloid dari fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*) memenuhi kriteria validasi metode analisis (spesifisitas, linieritas, *limit of detection* dan *limit of*

quantitation, akurasi, dan presisi) secara spektrofotometri UV-Vis?

2. Berapa kadar alkaloid total dalam fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*) secara spektrofotometri UV-Vis?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan metode yang valid untuk penetapan kadar alkaloid total secara spektrofotometri UV-Vis.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui metode analisis dalam penentuan kadar alkaloid total dari fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*), memenuhi kriteria validasi metode analisis (spesifisitas, linieritas, *limit of detection* dan *limit of quantitation*, akurasi, dan presisi) secara spektrofotometri UV-Vis.
2. Untuk mengetahui kadar alkaloid total dalam fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*) secara spektrofotometri UV-Vis.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Sumber informasi kepada peneliti tentang validasi metode analisis dari fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*).
2. Sebagai sumber data ilmiah bagi peneliti lanjutan, penelitian lainnya dan mahasiswa tentang metode analisis penentuan kadar alkaloid total dalam fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*), memenuhi

kriteria validasi metode analisis secara spektrofotometri UV-Vis.

3. Sebagai sumber data ilmiah atau rujukan bagi peneliti lanjutan, penelitian lainnya dan mahasiswa tentang kadar alkaloid total dalam fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*) secara spektrofotometri UV-Vis.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tumbuhan Sirsak

2.1.1 Klasifikasi Tumbuhan

Klasifikasi tumbuhan sirsak menurut Wardani,2020 sebagai berikut :

- Kingdom : *Plantae*
Divisio : *Spermatophyta*
Sub divisio : *Angiospermae*
Kelas : *Dicotyledonae*
Ordo : *Polycarpiceae*
Familia : *Annonaceae*
Genus : *Annona*
Spesies : *Annona muricata Linn*

2.1.2 Morfologi Tumbuhan Sirsak



Gambar 1. Tanaman Sirsak

Tanaman sirsak (*Annona muricata Linn*) merupakan tanaman tropis yang buahnya memiliki aroma dan rasa yang khas. Tanaman ini

memiliki tinggi tidak lebih dari 1000 meter di atas permukaan laut. Daun sirsak berbentuk lonjong, elips atau lonjong dengan ujung lancip. Permukaan daun halus dan mengkilap, bagian atas berwarna hijau tua sedangkan bagian bawah berwarna hijau muda. Akar tanaman sirsak cukup dalam karena dapat menembus tanah sampai kedalaman 2 meter. Bunga sirsak berwarna kuning atau kehijauan, terdiri atas kelopak-kelopak bunga yang tersusun sedemikian rupa sehingga membentuk kerucut. Bunga sirsak dapat tumbuh pada cabang, ranting, bahkan batang. Buah sirsak memiliki bentuk dasar kerucut, tetapi bentuknya tidak beraturan. Kulit buah berwarna hijau tua pada saat muda, namun warnanya akan berubah menjadi hijau kekuningan saat sudah masak. Buah memiliki duri-duri lunak berwarna hijau yang menyelimuti seluruh buah. Daging buah berwarna putih, beraroma khas, dan rasanya manis masam pada saat sudah masak. Biji sirsak berwarna hitam, lonjong, dan keras (Wicaksono, 2011).

2.1.3 Kandungan Kimia Daun Sirsak

Daun sirsak mengandung alkaloid, tanin, dan beberapa kandungan kimialainnya termasuk Annonaceous acetogenins. Acetogenins merupakan senyawa yang memiliki potensi sitotoksik. Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang dapat bersifat toksik untuk menghambat dan menghentikan pertumbuhan sel kanker (Mardiana, 2011). Acetogenins merupakan inhibitor kuat dari kompleks I mitokondria atau NADH dehidrogenase. Zat ini akan mengakibatkan penurunan produksi ATP yang akan menyebabkan kematian sel kanker, lalu kemudian memicu terjadinya

aktivasi jalur apoptosis sertamengaktifkan p53 yang dapat menghentikan siklus sel untuk mencegahterjadinya proliferasi tak terkendali (Retnani, 2011).

2.1.4 Khasiat Daun Sirsak

Daun sirsak dimanfaatkan sebagai pengobatan alternatif untuk pengobatan kanker, yakni dengan mengkonsumsi air rebusan daun sirsak. Selain untuk pengobatan kanker, tanaman sirsak juga dimanfaatkan untuk pengobatan demam, diare, anti kejang, anti jamur, anti parasit, anti mikroba, sakit pinggang, asam urat, gatal-gatal, bisul, flu, dan lain lain (Mardiana, 2011).

2.2 Ekstraksi

2.2.1 Definisi ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak awal perlu dipisahkan kedalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama (Mukhriani, 2014).

Ekstrak adalah sediaan yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang

sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan (Dirjen POM, 2000).

Umumnya, zat aktif yang terkandung dalam tanaman maupun hewan lebih larut dalam pelarut organik. Proses terekstraksinya zat aktif dalam tanaman adalah pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan terlarut sehingga terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan pelarut organik di luar sel. Maka larutan terpekat akan berdifusi ke luar sel, dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi suatu keseimbangan antara konsentrasi zat aktif di dalam sel dan di luar sel (Gennaro, 1990).

2.2.2 Tujuan ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik dan memisahkan senyawa yang mempunyai kelarutan berbeda-beda dalam berbagai pelarut komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan, hewan dan biota laut dengan menggunakan pelarut organik tertentu. (Dirjen POM, 2000).

2.2.3 Metode ekstraksi

Metode ekstraksi menggunakan pelarut dapat dilakukan secara dingin yaitu maserasi dan perkolasi, dan secara panas yaitu refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok (Dirjen POM, 2000).

1. Cara Dingin

a. Maserasi

Istilah *maceration* berasal dari bahasa latin *macerare*, yang artinya “merendam”. Merupakan proses paling tepat dimana obat (sampel) yang telah halus memungkinkan untuk direndam dalam menstrum sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut (Ansel, 2005).

Ekstraksi merupakan suatu cara untuk memisahkan campuran beberapa zat menjadi komponen-komponen yang terpisah. Ekstraksi juga dapat diartikan sebagai proses penarikan komponen atau zat aktif menggunakan pelarut tertentu. Proses ekstraksi bertujuan mendapatkan bagian-bagian tertentu dari bahan yang mengandung komponen bioaktif (Sudirman, 2011).

Secara umum ekstrak senyawa metabolit sekunder dari seluruh bagian tumbuhan seperti bunga, buah, daun, kulit batang dan akar dengan proses maserasi menggunakan pelarut organik polar.

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dalam pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang akan diekstraksi (Guether, 1987).

Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi bahan alam karena dalam perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel

sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan bahan alam dalam pelarut tersebut (Lenny, 2006).

b. Perkolasi

Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Proses perkolasi terdiri dari tahapan pengembang bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat).

2. Cara Panas

a Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

b Sokletasi

Sokletasi adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang pada umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

c Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50⁰ C.

d Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air, yakni 30 menit pada suhu 90-100⁰ C.

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah pemisahan antara zat cair dengan zat cair berdasarkan tingkat kepolarannya. Ekstrak dipartisi dengan menggunakan peningkatan polaritas seperti petroleum eter, n-heksana, kloroform, etil asetat, dan etanol. Pemilihan pelarut pada ekstraksi bergantung pada sifat analitnya dimana pelarut dan analit harus memiliki sifat yang sama, contohnya analit yang sifat lipofilitasnya tinggi akan terekstraksi pada pelarut yang relatif nonpolar seperti n-heksana sedangkan analit yang semipolar terlarut pada pelarut yang semipolar (Venn, 2008). Ekstrak awal merupakan campuran dari berbagai senyawa. Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama. Fraksinasi dapat dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair atau dengan kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom (KK), *size-exclusion chromatography* (SEC), *solid-phase extraction* (SPE) (Sarker, 2006).

Faktor-faktor yang mempengaruhi ekstraksi adalah:

a) Ukuran Bahan

Bahan yang akan diekstrak sebaiknya memiliki luas permukaan yang besar untuk mempermudah kontak antara bahan dengan pelarut sehingga ekstraksi berlangsung dengan baik (Hukmah, 2007). Kehalusan bubuk yang sesuai akan menghasilkan ekstraksi yang sempurna dalam waktu yang singkat (Guether, 1987).

b) Lama dan Suhu Ekstraksi

Lamanya waktu maserasi berbeda-beda tergantung pada sifat atau ciri campuran obat dan menstruum. Lamanya harus cukup supaya dapat memasuki semua rongga dari struktur sampel dan melarutkan semua zat yang mudah larut. Lamanya maserasi bisa memerlukan waktu beberapa jam atau beberapa hari untuk ekstraksi yang optimum (Ansel, 2005: 612).

Ekstraksi akan berlangsung cepat dilakukan pada suhu yang tinggi, tetapi hal ini dapat mengakibatkan beberapa komponen yang terdapat dalam rempah- rempah akan mengalami kerusakan (Hijaz, 2009). Ekstraksi yang baik dilakukan pada kisaran suhu 20 °C sampai 80 °C tetapi suhu yang digunakan harus di bawah titik didih pelarut yang digunakan. Semakin lama waktu ekstraksi, kesempatan untuk bersentuhan semakin besar sehingga hasil ekstraksi semakin bertambah banyak (Hukmah,2007).

2.3 Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa yang tersebar luas hampir pada semua jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan membentuk cincin heterosiklik (Harborne, 1984). Alkaloid dapat ditemukan pada biji, daun, ranting dan kulit kayu dari tumbuh-tumbuhan. Kadar alkaloid dari tumbuhan dapat mencapai 10-15%. Alkaloid kebanyakan bersifat racun, tetapi ada pula yang sangat berguna dalam pengobatan. Alkaloid merupakan senyawa tanpa warna, sering kali bersifat optik aktif, kebanyakan berbentuk Kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotin) pada suhu kamar (Sabirin, *et al.*, 1994).

Garam alkaloid dan alkaloid bebas biasanya berupa senyawa padat, berbentuk kristal tidak berwarna (berberina dan serpentina berwarna kuning). Alkaloid sering kali optik aktif, dan biasanya hanya satu dari isomer optik yang dijumpai di alam, meskipun dalam beberapa kasus dikenal campuran rasemat, dan pada kasus lain satu tumbuhan mengandung satu isomer sementara tumbuhan lain mengandung enantiomernya (Padmawinata, 1995).

Ada juga alkaloid yang berbentuk cair, seperti konina, nikotina, dan higrina. Sebagian besar alkaloid mempunyai rasa yang pahit. Alkaloid juga mempunyai sifat farmakologi. Sebagai contoh, morfina sebagai pereda rasa sakit, reserfina sebagai obat penenang, atrofina berfungsi

sebagai antispasmodia, kokain sebagai anestetik lokal, dan strisina sebagai stimulan syaraf (Ikan, 1969).

Sifat fisika kimia alkaloid dipengaruhi oleh kompleksitas dan variasi struktur kimia. Alkaloid bebas cukup larut dalam pelarut organik seperti kloroform, pelarut yang relatif non-polar (heksana, benzena, eter minyak bumi), pelarut bercampur, dan alkohol rendah (metanol, etanol). Alkaloid bebas praktis tidak larut atau sangat sedikit larut dalam air. Menariknya, garam alkaloid hampir bebas larut dalam air, relatif kurang larut dalam alkohol, dan sebagian besar larut atau sedikit larut dalam pelarut organik (Kar, 1996).

Alkaloid merupakan kelompok produk alami yang memiliki dampak yang besar sepanjang sejarah dalam hal ekonomi, kesehatan, politik, dan sosial manusia. Alkaloid memiliki efek fisiologis yang kuat pada sistem mamalia serta organisme lain, akibatnya beberapa alkaloid merupakan agen terapeutik penting (Shamsa dkk., 2008). Alkaloid memiliki aktivitas biologis, sehingga dimanfaatkan sebagai obat-obatan, stimulan, narkotika, dan racun (John dkk., 2014), selain itu alkaloid juga dilaporkan memiliki efek mikrobiosidal dan efek anti-diare karena efek yang ditimbulkan selama waktu transit di usus kecil dan kemampuan berinterkalasi dengan asam deoksiribonukleat (DNA) mikroba (Garba dan Okeniyi, 2012).

Alkaloid menunjukkan keberagaman dalam hal asal botani, biokimia, struktur kimia, dan aksi farmakologi. Hal tersebut

mengakibatkan banyaknya sistem klasifikasi alkaloid (Evans, 2002). Alkaloid dibagi menjadi dua kategori utama yakni alkaloid non-heterosiklik dan alkaloid heterosiklik (Kar, 1996). Alkaloid nonheterosiklik terkadang disebut protoalkaloid atau amin biologis, sedangkan alkaloid heterosiklik dibagi menjadi 14 grup berdasarkan struktur cincinnya (Evans, 2002).

Suatu cara mengklasifikasi alkaloid adalah didasarkan pada jenis cincin heterosiklik nitrogen yang terikat. Menurut klasifikasi ini alkaloid dibedakan menjadi ; piroolidin, piperidin, isoquinolin, quinolin dan indol. Alkaloid pada umumnya berbentuk kristal yang tidak berwarna, ada juga yang berbentuk cair seperti koniina, nikotin. Alkaloid yang berwarna sangat jarang ditemukan misalnya berberina berwarna kuning. Kebiasaan alkaloid menyebabkan senyawa ini mudah terdekomposisi terutama oleh panas, sinar dan oksigen membentuk N-oksida. Jaringan yang masih mengandung lemak, maka dilakukan ekstraksi pendahuluan petroleum eter.

Uji alkaloid dilakukan dengan cara melarutan ekstrak uji sebanyak 2 mL diuapkan di atas cawan porselin hingga di dapat residu. Residu kemudian dilarutkan dengan 5 mL HCl 2 N. Larutan yang didapat kemudian dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan HCl 2 N yang berfungsi sebagai blanko. Tabung kedua ditambahkan pereaksi Dragendorff sebanyak 3 tetes dan tabung ketiga ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan

jingga pada tabung kedua dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Jones and Kinghorn, 2006).

Sampel dikatakan mengandung alkaloid jika reaksi positif yang membentuk endapan sekurang-kurangnya dua reaksi dari golongan reaksi pengendapan yang dilakukan. Sebagian besar alkaloid tidak larut atau sedikit larut dalam air, tetapi bereaksi dengan asam membentuk garam yang larut dalam air. Alkaloid bebas biasanya larut dalam eter atau kloroform maupun pelarut nonpolar lainnya kebanyakan berbentuk kristal, meskipun ada beberapa yang amorf dan hanya sedikit yang berupa cairan pada suhu kamar. Garam alkaloid berbentuk kristal. Alkaloid biasanya tidak berwarna dan memiliki rasa pahit (Setiawan, 2013).

2.4 Penetapan Kadar Alkaloid Total

Beberapa metode dengan sensitivitas yang berbeda telah dikembangkan untuk penetapan kadar alkaloid dalam bahan tumbuhan, misalnya metode gravimetri, titrimetri, dan HPLC. Metode gravimetri dan titrimetri memiliki sensitivitas yang rendah. Metode gravimetri menghasilkan residu yang mengandung kotoran, ditunjukkan dengan hasil KLT yang menunjukkan lebih dari satu noda. Kelemahan metode titrimetri adalah *end-point* tertutup oleh warna ekstrak. Metode HPLC memiliki sensitivitas dan akurasi yang tinggi untuk penentuan satu atau lebih alkaloid individu, namun tidak berlaku untuk penetapan kadar alkaloid total dalam ekstrak karena terdapat berbagai jenis dan struktur alkaloid yang kompleks di dalamnya. Metode HPLC tidak dapat digunakan sebagai

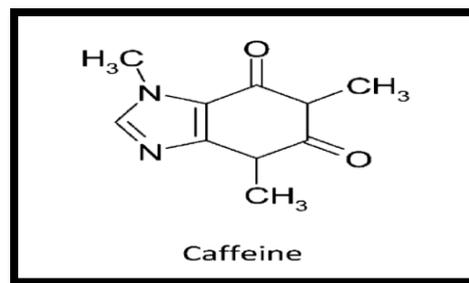
metode rutin untuk penentuan alkaloid total karena sangat mahal dan membutuhkan peralatan khusus (Shamsa dkk., 2008).

Penetapan kadar alkaloid total menggunakan metode spektrofotometri dengan *bromocresol green* (BCG) adalah metode yang sederhana, sensitif, stabil dan tidak membutuhkan peralatan yang sangat khusus. Metode tersebut memiliki keuntungan diantaranya adalah hemat waktu, dengan uji yang membutuhkan waktu rata-rata 1 jam (Shamsa dkk., 2008). Prinsip metode ini adalah pelarut organik tertentu dapat mengekstrak kompleks berwarna secara kuantitatif. Kompleks berwarna merupakan kombinasi dari BCG dan ion garam yang terbentuk oleh reaksi antara alkaloid dan ion hidrogen pada pH asam. Kandungan senyawa lain yang dapat larut dalam kloroform dihilangkan dengan cara dilakukan pencucian sebanyak tiga kali menggunakan kloroform sebelum direaksikan dengan BCG dan fase air ditampung. Hal ini bertujuan agar senyawa tersebut tidak ikut larut dalam kloroform pada saat ekstraksi kompleks dengan kloroform, sehingga hanya alkaloid yang akan ada pada larutan akhir (Shamsa dkk., 2008).

2.5 Kafein

Kafein adalah salah satu jenis alkaloid yang banyak terdapat dalam biji kopi, daun teh, dan biji coklat (Maramis, 2013). Struktur kimia kafein adalah 1,3,7-trimetilxantin dan termasuk dalam molekul xantin. Gugus metilnya berikatan dengan ketiga hidrogen dan nitrogen pada cincin xanthin. Kafein merupakan alkaloid putih dengan rumus senyawa kimia

$C_8H_{10}N_4O_2$, dan rumus bangun 1,3,7-trimetilxantin. Kafein mempunyai kemiripan struktur kimia dengan 3 senyawa alkaloid yaitu xantin, teofillin, dan teobromin (Lelyana, 2008). Nama IUPAC untuk kafein adalah 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6-dione (Erowid, 2011).



Gambar 2. Struktur Kafein

Kafein merupakan senyawa kimia alkaloid terkandung secara alami pada lebih dari 60 jenis tanaman terutama teh (1- 4,8 %), kopi (1-1,5 %), dan biji kola(2,7-3,6 %). Kafein diproduksi secara komersial dengan cara ekstraksi dari tanaman tertentu serta diproduksi secara sintetis. Kebanyakan produksi kafein bertujuan untuk memenuhi kebutuhan industri minuman. Kafein juga digunakan sebagai penguat rasa atau bumbu pada berbagai industri makanan (Misra *et al*, 2008).

Kafein merupakan sejenis alkaloid heterosiklik dalam golongan *methylxanthine*, yang menurut definisi berarti senyawa organik yang mengandung nitrogen dengan struktur dua-cincin atau dual-siklik. Molekul ini secara alami terjadi dalam banyak jenis tanaman sebagai metabolik sekunder. Fungsinya dalam tumbuhan adalah sebagai pestisida alami yang melumpuhkan dan membunuh serangga yang memakan tumbuhan

tersebut. Zat ini dihasilkan secara eksklusif dalam daun, kacang-kacangan dan buah-buahan lebih dari 60 tanaman, termasuk daun teh biasa (*Camellia sinensis*), kopi (*Coffea arabica*), kacang koko (*Theobroma cacao*), kacang kola (*Cola acuminata*) dan berbagai macam berry (Reinhardt, 2009).

Kafein memiliki efek farmakologis yang bermanfaat secara klinis, seperti menstimulasi susunan syaraf pusat, relaksasi otot polos terutama otot polos bronkus dan stimulasi otot jantung (Maramis, 2013). Kafein ditambahkan dalam jumlah tertentu ke minuman. Efek berlebihan (*overdosis*) mengkonsumsi kafein dapat menyebabkan gugup, gelisah, tremor, insomnia, hipertensi, mual dan kejang (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2002).

2.6 Spektrofotometri UV-Vis

2.6.1 Pengertian Spektrofotometri

Spektrofotometri sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spectrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energy relatif jika energy tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi panjang gelombang. Kelebihan spektrofotometer dengan fotometer adalah panjang gelombang dari sinar putih dapat lebih di deteksi dan cara ini diperoleh dengan alat pengurai seperti prisma, grating atau celah optis.

Pada fotometer filter dari berbagai warna yang mempunyai spesifikasi melewati trayek pada panjang gelombang tertentu(Gandjar,2007).

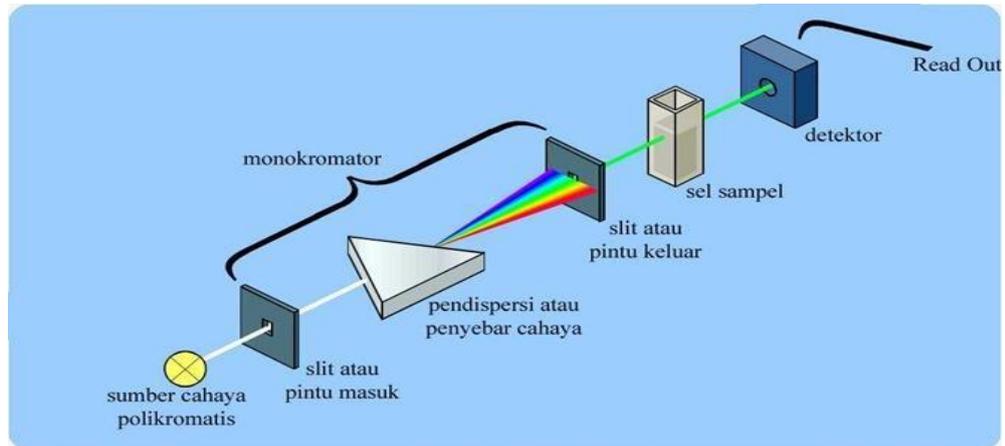
2.6.2 Prinsip Kerja Spektrofotometri

Spektrum elektromagnetik dibagi dalam beberapa daerah cahaya. Suatu daerah akan diabsorpsi oleh atom atau molekul dan panjang gelombang cahaya yang diabsorpsi dapat menunjukkan struktur senyawa yang diteliti. Spektrum elektromagnetik meliputi suatu daerah panjang gelombang yang luas dari sinar gamma gelombang pendek berenergi tinggi sampai pada panjang gelombang mikro (Marzuki Asnah 2012).

Spektrum absorpsi dalam daerah-daerah ultra ungu dan sinar tampak umumnya terdiri dari satu atau beberapa pita absorpsi yang lebar, semua molekul dapat menyerap radiasi dalam daerah UV-tampak. Oleh karena itu mereka mengandung electron, baik yang dipakai bersama atau tidak, yang dapat dieksitasi ke tingkat yang lebih tinggi. Panjang gelombang pada waktu absorpsi terjadi tergantung pada bagaimana erat elektron terikat di dalam molekul. Elektron dalam satu ikatan kovalen tunggal erat ikatannya dan radiasi dengan energy tinggi, atau panjang gelombang pendek, diperlukan eksitasinya (Wunas,2011).

Keuntungan utama metode spektrofotometri adalah bahwa metode ini memberikan cara sederhana untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil. Selain itu, hasil yang diperoleh cukup akurat, dimana angka yang terbaca langsung dicatat oleh detector dan tercetak dalam bentuk

angka digital ataupun grafik yang sudah diregresikan (Yahya S,2013).Instrument spektrofotometri yang sederhana disebut terdiri dari :

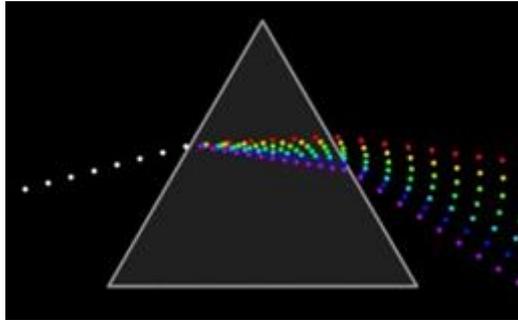


Sumber cahaya – monokromatis – sel sampel – detector- read out

Gambar 3. Bagian Instrument Spektrofotometri

Fungsi masing-masing bagian :

1. Sumber sinar polikromatis berfungsi sebagai sumber sinar polikromatis dengan berbagai macam rentang panjang gelombang.
2. Monokromator berfungsi sebagai penyeleksi panjang gelombang yaitu mengubah cahaya yang berasal dari sumber sinar polikromatis menjadi cahaya monokromatis. Pada gambar di atas disebut sebagai pendispersi atau penyebar cahaya. dengan adanya pendispersi hanya satu jenis cahaya atau cahaya dengan panjang gelombang tunggal yang mengenai sel sampel. Pada gambar di atas hanya cahaya hijau yang melewati pintu keluar. Proses dispersi atau penyebaran cahaya seperti yang tertera pada gambar 4.



Gambar 4. Proses Dispersi Cahaya

3. Sel sampel berfungsi sebagai tempat meletakansampel UV-Vis menggunakan kuvet sebagai tempat sampel. Kuvet biasanya terbuat dari kuarsa atau gelas, namun kuvet dari kuarsa yang terbuat dari silica memiliki kualitas yang lebih baik. Hal ini disebabkan yang terbuat dari kaca dan plastik dapat menyerap UV sehingga penggunaannya hanya pada spektrofotometer sinar tampak (Vis). Kuvet biasanya berbentuk persegi panjang dengan lebar 1 cm.
4. Detektor berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik. Macam-macam detector yaitu Detektor foto (Photo detector), Photocell, misalnya CdS, Phototube, Hantaran foto, Dioda foto, Detektor panas.
5. Read out merupakan suatu sistem baca yang menangkap besarnya isyarat listrik yang berasal dari detector. Adapun hal-hal yang harus diperhatikan dalam spektrofotometri adalah:
 - a. Pada saat pengenceran alat alat pengenceran harus betul-betul bersih tanpa adanya zat pengotor

- b. Dalam penggunaan alat-alat harus betul-betul steril
- c. Jumlah zat yang dipakai harus sesuai dengan yang telah ditentukan
- d. Dalam penggunaan spektrofotometri UV, sampel harus jernih dan tidak keruh
- e. Dalam penggunaan spektrofotometri UV-vis, sampel harus berwarna.

Serapan dapat terjadi jika foton/radiasi yang mengenai cuplikan memiliki energi yang sama dengan energi yang dibutuhkan untuk menyebabkan terjadinya perubahan tenaga. Jika sinar monokromatik dilewatkan melalui suatu lapisan larutan dengan ketebalan (db), maka penurunan intensitas sinar (dI) karena melewati lapisan larutan tersebut berbanding langsung dengan intensitas radiasi (I), konsentrasi spesies yang menyerap (c), dan dengan ketebalan lapisan larutan (db). Secara matematis, pernyataan ini dapat dituliskan :

$$-dI = kIcdb$$

bila diintegrasikan maka diperoleh persamaan ini :

$$I = I_0 e^{-kbc}$$

dan bila persamaan di atas diubah menjadi logaritma basis 10, maka akan diperoleh persamaan :

$$I = I_0 10^{-kbc}$$

dimana : $k/2,303 = a$, maka persamaan di atas dapat diubah menjadi persamaan :

$$\text{Log } I_0/I = abc \quad \text{atau} \quad A = abc \quad (\text{Hukum Lambert-Beer})$$

Dimana :

A = Absorban

a = Absorptivitas

b = Tebal kuvet (cm)

c = Konsentrasi

Absorbansi (A) dihubungkan dengan Transmittan (T) = I/I_0 maka dapat diperoleh $A = \log 1/T$. *Absorptivitas* (a) merupakan suatu konstanta yang tidak tergantung pada konsentrasi, tebal kuvet, dan intensitas radiasi yang mengenai larutan sampel. Tetapi tergantung pada suhu, pelarut, struktur molekul, dan panjang gelombang radiasi (Hariadi Arsyad, 2013).

2.6.3 Hukum Lambert Beer

Cahaya yang diserap diukur sebagai absorbansi (A) sedangkan cahaya yang hamburkan diukur sebagai transmittansi (T), dinyatakan dengan hukum Lambert-Beer atau Hukum Beer, berbunyi:

“Jumlah radiasi cahaya tampak (ultraviolet, inframerah dan sebagainya) yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan”.

Berdasarkan hukum Lambert-Beer, rumus yang digunakan untuk menghitung banyaknya cahaya yang di hamburkan:

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad \text{atau} \quad \%T = \frac{I_t}{I_0} \times 100 \%$$

dan absorbansi dinyatakan dengan rumus:

$$A = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_0}$$

dimana I_0 merupakan intensitas cahaya datang dan I_t atau I_1 adalah intensitas cahaya setelah melewati sampel.

Rumus yang diturunkan dari Hukum Beer dapat ditulis sebagai:

$$A = a \cdot b \cdot c \quad \text{atau} \quad A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

dimana:

A = Absorbansi

b / l = Tebal larutan (tebal kuvet diperhitungkan juga umumnya 1 cm)

c = Konsentrasi larutan yang diukur

ϵ = Tetapan absorptivitas molar (jika konsentrasi larutan yang diukur dalam molar)

a = Tetapan absorptivitas (jika konsentrasi larutan yang diukur dalam ppm).

Faktor-faktor yang sering menyebabkan kesalahan dalam menggunakan spektrofotometer dalam mengukur konsentrasi suatu analit:

1. Adanya serapan oleh pelarut. Hal ini dapat diatasi dengan penggunaan blangko, yaitu larutan yang berisi selain komponen yang akan dianalisis termasuk zat pembentuk warna.
2. Serapan oleh kuvet. Kuvet yang ada biasanya dari bahan gelas atau kuarsa, namun kuvet dari kuarsa memiliki kualitas yang

lebih baik.

3. Kesalahan fotometrik normal pada pengukuran dengan absorbansi sangat rendah atau sangat tinggi, hal ini dapat diatur dengan pengaturan konsentrasi, sesuai dengan kisaran sensitivitas dari alat yang digunakan (melalui pengenceran atau pemekatan) (Sri Suyono, 2013)

2.6.4 Warna Komplementer

Radiasi atau cahaya putih dilewatkan melalui larutan yang berwarna maka radiasi dengan panjang gelombang tertentu akan diserap secara selektif dan radiasi sinar lainnya akan diteruskan. Absorbansi maksimum dari larutan berwarna terjadi pada daerah warna yang berlawanan dengan warna yang diamati, misalnya larutan berwarna merah akan menyerap radiasi maksimum pada daerah warna hijau. Dengan kata lain warna yang diserap adalah warna komplementer dari warna yang diamati (Suharta,2005).

Tabel 1. Spektrum Cahaya Tampak dan Warna-warna Komplementer

Panjang Gelombang (nm)	Warna	Warna Komplementer
400-435	Violet	Kuning-Hijau
435-480	Biru	Kuning
480-490	Hijau-Biru	Oranye
490-500	Biru – Hijau	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Kuning – hijau	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-610	Oranye	Hijau – biru
610-750	Merah	Biru-Hijau

Day dan AL.Underwood,2002

2.6.5 Spektrofotometri Visible

Spektrofotometri UV-Vis yang digunakan sebagai sumber sinar/energi adalah cahaya tampak (visible). Cahaya visible termasuk spektrum elektromagnetik yang dapat ditangkap oleh mata manusia. Panjang gelombang sinar tampak adalah 380 sampai 750 nm. Sehingga semua sinar yang dapat dilihat oleh kita, entah itu putih, merah, biru, hijau, apapun..selama ia dapat dilihat oleh mata, maka sinar tersebut termasuk ke dalam sinar tampak (visible). Sumber sinar tampak yang umumnya dipakai pada spektro visible adalah lampu *Tungsten*. Sample yang dapat dianalisa dengan metode ini hanya sample yang memiliki warna. Hal ini menjadi kelemahan tersendiri dari metode spektrofotometri visible. Oleh karena itu,

untuk sample yang tidak memiliki warna harus terlebih dulu dibuat berwarna dengan menggunakan reagent spesifik.

2.7 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode analisis bertujuan untuk mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut dapat sesuai untuk peruntukannya (Gandjar, 2007). Validasi metode analisis juga merupakan proses yang dilakukan melalui percobaan laboratorium dimana karakteristik dari suatu prosedur memenuhi persyaratan untuk aplikasi analisis (USP XXXVII, 2014). Validasi metode merupakan proses untuk memastikan bahwa prosedur yang memenuhi standar reliabilitas, akurasi, presisi sesuai tujuan yang diharapkan (Ahuja dan Dong, 2005). Validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Gandjar dan Rohman, 2014). Menurut Harmita pada Tahun 2004, validasi metode analisis adalah suatu tindakan parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan dalam penggunaannya.

Prosedur analisis yang harus divalidasi meliputi beberapa jenis pengujian, yaitu adanya pengotor, uji limit untuk mengendalikan keberadaan pengotor, serta uji kuantitatif komponen aktif atau komponen

lain dalam produk obat – obatan. Selain itu, terdapat 8 parameter validasi metode analisis yaitu spesifitas, presisi atau ketelitian, akurasi atau ketepatan, linieritas, kisaran, limit deteksi, limit kuantitas dan ketangguhan. Pemilihan parameter yang akan diuji tergantung dari jenis dan metode pengujian yang akan divalidasi (Chan, 2004).

Parameter ini berkaitan dengan sejauh mana zat lain mengganggu identifikasi atau analisis kuantifikasi analit. Ukuran dari kemampuan metode untuk mengidentifikasi atau mengukur analit. Kehadiran zat lain baik endogen maupun eksogen, dalam sampel matriks dibawah kondisi yang dinyatakan metode ini. Kekhususan ditentukan dengan menambahkan bahan – bahan yang mungkin dihadapi didalam sampel misalnya, tes spesifitas metode imunologi untuk specimen biologi dapat berpotensi zat bereaksi mengganggu zat yang dapat menghambat atau menutupi warna reaksi; metode kromatografi untuk penentuan konsentrasi obat penyalahgunaan dalam sampel klinis harus bebas dari gangguan dari yang diharapkan bersamaan diberikan obat terapi. Spesifitas adalah tergantung konsentrasi dan harus ditentukan pada akhir rendah dari kisaran kalibrasi. Untuk memenuhi tujuan metode dan memastikan bahwa efek dari kotoran, zat bereaksi silang, yang mungkin ada dalam matriks diketahui (Riyanto, 2014).

2.7.1 Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam

matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks. (Rohman, 2007).

International Conference Harmonisation membagi spesifisitas dalam 2 kategori, yakni uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran. Untuk tujuan identifikasi, spesifitas ditunjukkan dengan kemampuan suatu metode analisis untuk membedakan antar senyawa yang mempunyai struktur molekul yang hampir sama. Untuk tujuan uji kemurnian dan tujuan pengukuran kadar, spesifitas ditunjukkan oleh daya pisah 2 senyawa yang berdekatan (sebagaimana dalam kromatografi) senyawa-senyawa tersebut biasanya adalah komponen utama atau komponen aktif dan atau suatu pengotor. Jika dalam suatu uji terdapat suatu pengotor (*Impurities*) maka metode uji harus tidak terpengaruh dengan adanya pengotor ini.

Penentuan spesifisitas metode dapat diperoleh dengan 2 jalan. Yang pertama (dan yang paling diharapkan), adalah dengan melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa- senyawa lain (Resolusi senyawa yang dituju ≥ 2). Cara kedua untuk memperoleh spesifisitas adalah dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama sebagai contoh, detektor elektrokimia atau detektor fluoresent hanya akan mendeteksi senyawa tertentu, sementara senyawa yang lainnya tidak terdeteksi. Penggunaan detektor UV pada panjang gelombang yang spesifik juga merupakan cara yang efektif untuk

melakukan pengukuran selektifitas. Deteksi analit secara selektif dengan detektor UV dapat ditingkatkan dengan menggunakan teknik derivatisasi dan dilanjutkan dengan pengukuran pada panjang gelombang tertentu yang spesifik terhadap derivat yang dihasilkan.

2.7.2 Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

Linieritas harus terdapat dalam rentang metode analisis. Penentuan linieritas dengan cara membuat plot sinyal respon hasil pengukuran sebagai fungsi dari konsentrasi analit, selanjutnya dianalisis secara matematis melalui perhitungan garis regresi dengan metode *least square*. Hubungan linieritas yang baik ditunjukkan oleh koefisien korelasi. ICH merekomendasikan untuk penentuan linieritas menggunakan minimal 5 konsentrasi dengan minimal rentang tertentu yaitu untuk pengujian senyawa obat atau produk jadi sekitar 80-120% dari konsentrasi larutan uji (USP, 2016).

Parameter hubungan kelinieran yang digunakan yaitu koefisien korelasi (r) dan koefisien determinasi (R) pada analisis regresi linier $y = bx + a$ (b adalah slope, a adalah intersep, x adalah konsentrasi analit dan y adalah respon instrumen). Koefisien determinasi adalah rasio dari variasi

yang dijelaskan terhadap variasi keseluruhan. Nilai rasio ini selalu tidak negatif sehingga ditandai dengan R^2 . Koefisien korelasi adalah suatu ukuran hubungan linier antara dua set data dan ditandai dengan r . Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $a = 0$ dan $r = +1$ atau -1 merupakan hubungan yang sempurna, tanda $+$ dan $-$ bergantung pada arah garis (Riyanto, 2014).

Selain itu, beberapa parameter dapat digunakan, misalnya, nilai standar deviasi relatif dari proses (V_{x0}), nilai X_p , analisis varians (ANOVA). Pengukuran nilai linieritas dengan menggunakan koefisien korelasi (r) saja tidak direkomendasikan lagi. Oleh karena itu untuk menunjukkan linearitas, dibutuhkan pengukuran parameter lain seperti nilai V_{x0} , X_p dan *ANOVA linear testing*.

2.7.3 *Limit Of Detection (LOD)*

LOD atau batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau dibawah nilai tertentu. Definisi batas deteksi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas deteksi merupakan kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko (y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko ($3S_b$) (Rohman, 2007).

Limit Of Detection seringkali diekspresikan sebagai suatu konsentrasi pada rasionya 2 atau 3 dibanding 1. ICH mengenalkan suatu

konvensi metode *signal to noise ratio* ini, meskipun demikian ICH juga menggunakan 2 metode pilihan lain untuk menentukan LOD yakni: Metode non instrumental visual dan dengan metode perhitungan. Metode non instrumental visual digunakan pada teknik kromatografi lapis tipis dan pada metode titrimetri. LOD juga dapat dihitung berdasarkan pada standar deviasi (SD) responden kemiringan (*Slope*,*S*) kurva baku pada level yang mendekati LOD sesuai dengan rumus, $LOD = 3,3 (SD/S)$. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan pada standar deviasi blanko, pada standar deviasi residual dari garis regresi atau standar deviasi intersep y pada garis regresi (Harmita, 2004).

2.7.4 *Limit of Quantification* (LOQ)

LOQ atau batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Sebagaimana LOD, LOQ juga diekspresikan sebagai konsentrasi (dengan akurasi dan presisi juga dilaporkan). Kadang-kadang rasio *signal to noise* 10:1 digunakan untuk menentukan LOQ. Perhitungan LOQ dengan rasio *signal to noise* 10:1 merupakan aturan umum, meskipun demikian perlu diingat bahwa LOQ merupakan suatu kompromi antara konsentrasi dengan presisi dan akurasi yang dipersyaratkan. Jadi, jika konsentrasi LOQ menurun maka presisi juga menurun. Jika presisi tinggi dipersyaratkan, maka konsentrasi LOQ yang lebih tinggi harus dilaporkan. (Rohman, 2007).

International Conference Harmonisation mengenalkan metode rasio *signal to noise* ini, meskipun demikian sebagai mana dalam perhitungan LOD, ICH juga menggunakan 2 metode untuk menentukan LOQ yaitu: (1. metode non instrumental visual) dan (2. metode perhitungan). Sekali lagi, metode perhitungan didasarkan pada standar deviasi respon (SD) dan *slope* (S) kurva baku sesuai dengan rumus: $LOQ = 10 (SD/S)$ standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blanko pada standar deviasi residual garis regresi linier atau dengan standar deviasi interseppada garisregresi.

2.7.5 Presisi

Presisi atau *precision* adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Presisi dapat dinyatakan sebagai *repeatability* (keterulangan) atau *reproducibility* (ketertiruan) (Riyanto, 2014).

Repeatability adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. *Reproducibility* adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisispresisi dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analis yangberbeda pula. Presisi intermediet

didapatkan saat analisis dilakukan dalam satu laboratorium oleh analis yang berbeda selama beberapa hari atau minggu, menggunakan peralatan, reagen dan kolom yang berbeda.

Presisi dari metode uji ditentukan dengan rumus :

$$RSD = \frac{SD}{X} \times 100\%$$

Persyaratan presisi berdasarkan % RSD yang bergantung pada jumlah analit dalam sampel. Tabel 2 menunjukkan persyaratan presisi dari nilai % RSD untuk jumlah analit dalam sampel (AOAC, 2013).

Tabel 2. Persyaratan presisi

Konsentrasi analit dalam sampel	Batas % RSD
100%	1
10%	1,5
1%	2
0,1%	3
0,01%	4
10 µg/g (ppm)	6
1 µg/g	8
10 µg/Kg (ppb)	15

2.7.6 Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi

dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam plasebo (semua campuran reagen yang digunakan minus analit), lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar standar yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), atau ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 30% – 60% kali dari kadar analit yang diperkirakan (Riyanto, 2014).

Perhitungan persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan rumus matematik sebagai berikut:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Konsentrasi hasil percobaan}}{\text{Konsentrasi teoritis}} \times 100\%$$

Persyaratan % rekoverti untuk bahan alam berdasarkan konsentrasi analit yang berada dalam sampel sesuai *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (AOAC, 2013) tertera pada tabel 3 yaitu persyaratan % rekoverti (AOAC, 2013).

Tabel 3. Persyaratan persen rekovert

Konsentrasi analit dalam sampel	Batas % rekovert
100%	98-101
10%	95-102
1%	92-105
0,1%	90-108
0,01%	85-110
10 µg/g (ppm)	80-115
1 µg/g	75-120
10 µg/Kg (ppb)	70-125

2.7.7 Kisaran (Range)

Kisaran suatu metode didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dan tertinggi yang mana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linieritas yang mencukupi. Kisaran-kisaran konsentrasi yang diuji tergantung pada jenis metode dan kegunaannya. Untuk pengujian komponen utama (Mayor), maka konsentrasi baku harus diukur didekat atau sama dengan konsentrasi kandungan analit yang diharapkan. Suatu strategi yang baik adalah mengukur baku dengan kisaran 25, 50, 75, 100, 125, dan 150% dari konsentrasi analit yang diharapkan (Rohman, 2007).

2.7.8 Ketangguhan/Kekasaran (*ruggedness*)

Kekasaran merupakan tingkat reproduibilitas hasil yang diperoleh dibawah kondisi yang bermacam-macam yang diekspresikan sebagai persen standar deviasi relatif (% RSD) kondisi-kondisi ini meliputi

laboratorium, analisis, alat, reagen, dan waktu percobaan yang berbeda (Rohman, 2007).

Kekasaran suatu metode mungkin tidak akan diketahui jika suatu metode dikembangkan pertama kali, akan tetapi kekasaran suatu metode akan kelihatan jika digunakan berulang kali. Suatu pengembangan metode yang bagus mensyaratkan suatu evaluasi yang sistematis terhadap faktor-faktor penting yang mempengaruhi kekasaran suatu metode (Rohman, 2007).

Strategi untuk menentukan kekasaran suatu metode akan bervariasi tergantung pada kompleksitas metode dan waktu yang tersedia untuk melakukan validasi. Penentuan kekasaran metode dapat dibatasi oleh kondisi kondisi percobaan yang kritis, misalkan pengecekan pengaruh kolom kromatografi yang berbeda pabrik dan jenisnya sama atau pengaruh pengaruh operasionalisasi metode pada laboratorium yang berbeda. Dalam kasus seperti ini semua faktor harus dijaga konstan seperti fase gerak dan reagen yang digunakan (Rohman, 2007).

2.7.9 Kekuatan/Ketahanan (*Robustness*)

Ketahanan merupakan kapasitas metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Ketahanan dievaluasi dengan melakukan variasi parameter-parameter metode seperti: persentase pelarut organik pH kekuatan ionik, suhu dan sebagainya. Suatu praktek yang baik untuk mengevaluasi ketahanan suatu metode adalah dengan memvariasi parameter-parameter penting dalam suatu metode

secara sistematis lalu mengkuatr pengaruhnya pada pemisahan. Sebagai contoh, jika suatu metode menggunakan asetonitril 36%-air sebagai fase geraknya, maka seorang analis lalu memvariasi persentase asetonitrilnya menjadi misalkan 33, 36, dan 39% lalu melihat pengaruhnya pada waktu retensi analit yang diuji (Rohman, 2007).

2.7.10 Stabilitas

Untuk memperoleh hasil-hasil analisis yang reproduibel dan reliabel, maka sampel, reagen dan baku yang digunakan harus stabil pada waktu tertentu (misalkan 10 hari, 1 minggu, 1 bulan, atau tergantung kebutuhan). Sebagai contoh, suatu analisis untuk pengujian suatu sampel dapat membutuhkan 10 atau lebih perlakuan kromatografi; yakni untuk menentukan kesesuaian sistem, termasuk didalamnya konsentras baku untuk membuat kurva baku dan juga untuk membuat 2 atau 3 kali replikasi terhadap sampel yang akan diuji. Dengan demikian, untuk melakukan analisis suatu sampel saja dibutuhkan waktu beberapa jam, kareny selama analisis harus dipastikan bahwa sampel, regen, dan pelarut yang digunakan stabil. Untuk analisis sampel dalam jumlah yang banyak, maka dibutuhkan waktu yang lebih lama lagi sehingga stabilitas dapat menjadi faktor yang kritis pada validasi metode (Rohman, 2007).

Stabilitas semua larutan dan reagen sangatlah penting, baik yang berkaitan dengan suhu atau yang berkaitan dengan waktu. Jika larutan tidak stabil, pada penurunan suhu hingga 2-8°C dapat meningkatkan stabilitas sampel dan standar. Pendingin dalam autosampler biasanya

tersedia untuk keperluan ini. Stabilitas juga penting, terkait dengan waktu pengerjaan. Sebagai contoh, analisis secara gradien selama 100 menit tentunya membutuhkan fase gerak dengan stabilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan analisis secara isokratik selama 5menit.

Fase gerak haruslah dipilih sedemikian rupa sehingga menghindari masalah-masalah yang terkait dengan stabilitas. Sebagai contoh, fase gerak yang mengandung THF diduga akan mengalami oksidasi. Oleh karena itu, fase gerak seperti ini harus disiapkan setiap hari dengan menggunakan THF yang baru. Beberapa fase gerak yang mengandung buffer dapat mengakibatkan masalah, misalkan fase gerak yang mengandung fosfat dan asetat akan mudah ditumbuhi bakteri, karena fosfat dan asetat merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikrobial. Natrium azida dengan konsentrasi 0,1% biasanya ditambahkan untuk menghindari pertumbuhan bakteri ini. Penambahan pelarut organik dengan konsentrasi lebih dari 1% juga merupakan cara yang efektif (Rohman, 2007).

2.7.11 Uji Kesesuaian Sistem

Sebelum melakukan analisis setiap hari, seorang analis harus memastikan bahwa sistem dan prosedur yang digunakan harus mampu memberikan data yang dapat diterima. Hal ini dapat dilakukan dengan percobaan kesesuaian sistem yang didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Persyaratan- persyaratan kesesuaian sistem

biasanya dilakukan setelah dilakukan pengembangan metode dan validasi metode (Rohman, 2007).

Farmakope Amerika (*United States Pharmacopeia*, USP) menentukan parameter-parameter yang dapat digunakan untuk menetapkan kesesuaian sistem sebelum analisis. Parameter-parameter yang digunakan meliputi: bilangan lempeng teori (N), faktor tailing, Kapasitas (K" atau A) dan nilai standar deviasi relatif (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi. Pada umumnya, paling tidak ada dua kriteria yang biasanya dipersyaratkan untuk menunjukkan kesesuaian sistem suatu metode. Nilai RSD tinggi puncak atau luas puncak dari 5 kali injeksi larutan baku pada dasarnya dapat diterima sebagai salah satu kriteria baku untuk pengujian komponen yang jumlahnya banyak (komponen mayor) jika nilai $RSD \leq 1\%$ untuk 5 kali injeksi. Sementara untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, nilai RSD dapat diterima jika antara 5-15% (Rohman, 2007).

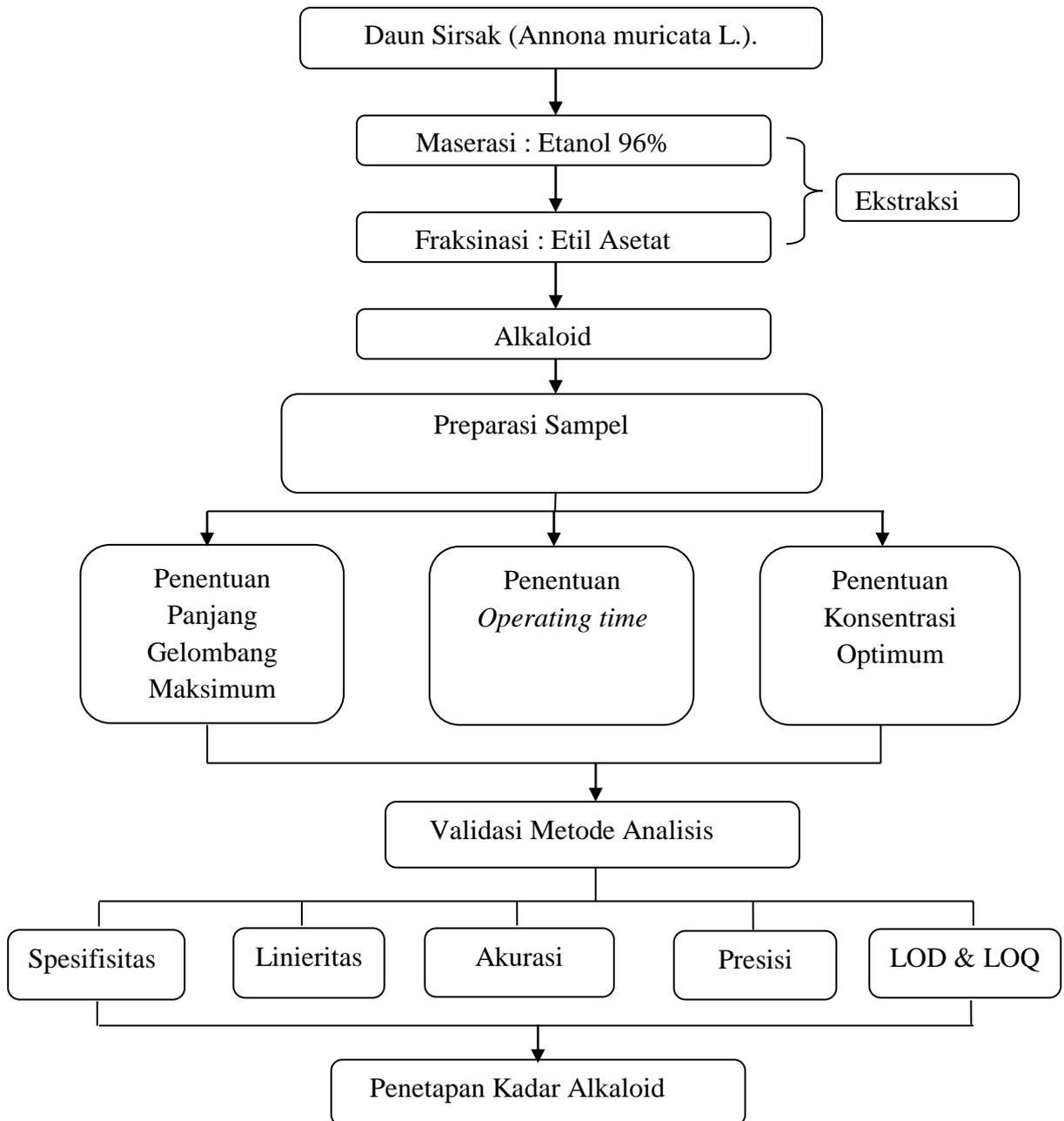
Baik *United States Pharmacopeia* maupun *Internasional Conference on Harmonization* telah memperkenalkan bahwa tidak selamanya parameter untuk mengevaluasi validasi metode diuji. USP membagi metode analisis kedalam kategori yang terpisah, yaitu:

1. Penentuan kuantitatif komponen-komponen utama atau bahan aktif
2. Penentuan pengotor (*Impurities*) atau produk-produk hasil degradasi
3. Penentuan karakteristik kinerja
4. Pengujian identifikasi

Untuk uji kategori 1, evaluasi nilai LOD dan LOQ tidak begitu penting karena komponen utama atau bahan aktif pada umumnya berada dalam jumlah yang besar. Pengujian kategori 2, dapat dibagi lagi menjadi 2 sub – kategori, yaitu analisis kuantitatif dan uji batas. Jika yang diharapkan adalah informasi kuantitatifnya maka parameter LOD tidak begitu penting, tetapi parameter yang lain dibutuhkan. Keadaan yang berlawanan berlaku untuk uji batas, karena informasi kuantitatifnya tidak dibutuhkan maka pengukuran LOD, spesifisitas, dan kekasaran sudah mencukupi. Untuk mengetahui elemen data yang dibutuhkan untuk uji validasi dan karakteristik validasi menurut ICH dan jenis prosedur analisisnya. (Rohman, 2007).

BAB III. KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 5. Kerangka konsep

3.2 Hipotesis Penelitian

Validasi metode analisis pada fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*) secara spektrofotometri UV-Vis dapat memenuhi persyaratan parameter-parameter validasi metode analisis spesifisitas, linieritas, *limit of detection* dan *limit of quantitation*, akurasi, dan presisi.

BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian adalah suatu cara ilmiah untuk mendapatkan data dengan tujuan dan kegunaan tertentu (Sugiyono, 2017). Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan desain penelitian eksperimental kuantitatif dengan pendekatan penelitian deskriptif.

Penelitian kuantitatif adalah metode penelitian yang berlandaskan pada filsafat positifisme, digunakan untuk meneliti pada populasi atau sampel tertentu, pengumpulan data menggunakan instrument penelitian, analisis data bersifat kuantitatif atau statistik, dengan tujuan untuk menguji hipotesis yang telah ditetapkan (Sugiyono, 2017).

Pendekatan deskriptif adalah metode penelitian deskriptif ini dilakukan untuk mengetahui keberadaan variabel mandiri, baik hanya pada satu variabel atau lebih (variabel yang berdiri sendiri atau variabel bebas) tanpa membuat perbandingan variabel itu sendiri dan mencari hubungan dengan variabel lain (Sugiyono, 2017).

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 ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2013). Dalam penelitian ini populasinya adalah tanaman sirsak (*Annona*

muricata L.).yang berada di desa Kemiri Kecamatan Panti Kabupaten Jember.

4.2.2 Sampel

Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut sampel yang diambil dari populasi tersebut harus betul-betul representative (mewakili) (Sugiyono, 2012). Sampel penelitian ini adalah bagian daun tanaman sirsak (*Annonamuricata L.*).

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember untuk melaksanakan proses pengolahan sampel daun sirsak (*Annona muricata L.*).dan dilanjutkan menggunakan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember mulai bulan Februari hingga April 2021.

4.4 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah suatu definisi yang diberikan kepada suatu variabel dengan cara memberikan arti atau menspesifikasi kegiatan, ataupun memberikan suatu operasional yang diperlukan untuk mengukur variabel tersebut (Nazir,1999). Kegunaan definisi operasional dalam penelitian adalah untuk memberi batasan dan pengertian yang jelas tentang variabel sehingga tidak terjadi kesalah fahaman mengenai data yang akan dikumpulkan dan menghindari kesesatan alat pengumpulan data. Adapun definisi operasional dari penelitian ini antara lain:

Tabel 4. Definisi Operasional Variabel

Variabel penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel Bebas / <i>Independent Variable</i>					
Fraksi Etil Asetat	Fraksi etil asetat hasil ekstraksi menggunakan ekstraksi fraksinasi secara cair-cair (ECC) menggunakan pelarut etil asetat.	Timbangan analitik	Menghitung persen rendemen fraksi etil asetat.	Dinyatakan dalam persen.	Ratio
Variabel Terikat / <i>Dependent Variable</i>					
Validasi Metode Analisis	Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.	Spektrofotometri UV-Vis	<ol style="list-style-type: none"> 1. Spesifisitas : membandingkan spektra sampel dan standar. 2. Linieritas : menghitung nilai r. 3. Lod dan Loq : menghitung konsentrasi terkecil. 4. Akurasi : menghitung presentase recovery 5. Presisi : menghitung nilai koefisien variasi. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dinyatakan dalam satuan mg/L. 2. Dinyatakan dalam nilai r dan V_{x_0}. 3. Dinyatakan dalam mg/L. 4. Dinyatakan dalam persen Recovery. 5. Dinyatakan dalam persen RSD. 	Ratio

Kadar Alkaloid Total	Kadar alkaloid total adalah jumlah kandungan total senyawa alkaloid yang dari fraksi etil asetat daun sirsak (<i>Annona muricata L.</i>)	Spektrofotometri UV-Vis	Menghitung kadar (x) dari hasil persamaan regresi.	Dinyatakan dalam satuan % b/b.	Ratio
----------------------	--	-------------------------	--	--------------------------------	-------

4.5 Pengumpulan dan Analisa Data

4.5.1 Teknik pengumpulan

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman adalah identifikasi suatu tanaman sehingga nama ilmiah tanaman tersebut diketahui. Selain itu juga bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas suatu tanaman untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan tanaman (Faisal *et al*, 2018). Determinasi tanaman pada penelitian ini dilakukan di Politeknik Kesehatan Negeri Jember.

2. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan sebanyak 3 kg daun sirsak pada pagi hari (Jam 06.00 WIB) yang diperoleh dari Desa Kemiri Kecamatan Panti Kabupaten Jember. Sampel yang digunakan adalah bagian daun sirsak. Pengambilan sampel dengan cara memetik daun sirsak yang tua.

3. Pengolahan sampel

Pengolahan sampel meliputi pengeringan sampel daun sirsak dengan cara diangin-anginkan, tidak terkena paparan sinar matahari langsung. Pengeringan dilakukan untuk menghilangkan kadar air dalam bahan untuk memperlancar proses analisis dan menambah daya awet bahan tersebut selanjutnya daun sirsak dihaluskan menggunakan blender sehingga bisa dilakukan proses ekstraksi.

4. Ekstraksi sampel

Serbuk simplisia daun sirsak ditimbang sejumlah 500 gram, lalu dimasukkan ke dalam maserator, kemudian ditambahkan 2 liter pelarut etanol 96%. Serbuk daun sirsak direndam dalam pelarut etanol selama 5 hari dengan pengadukan setiap 24 jam kemudian disaring menggunakan corong *Buchner*. Filtrat yang didapatkan dipekatkan dengan menggunakan *rotavapour* pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm. Pelarut etanol hasil *rotavapour* digunakan kembali untuk remaserasi selama 5 hari dengan pengadukan setiap 24 jam kemudian disaring menggunakan corong *buchner*. Filtrat yang didapatkan dipekatkan dengan menggunakan *rotavapour* pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm. Ekstrak kental yang diperoleh diambil dan dituang ke dalam vial. Rendemen Ekstrak etanol daun sirsak yang didapatkan dihitung dan disimpan dalam desikator.

5. Fraksinasi Sampel

Ekstrak kental daun sirsak ditimbang sebanyak 5 gram dilarutkan dengan aquadest 50 mL. Filtrat dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu dipartisi dengan etil asetat sebanyak 50 mL dan dilakukan pengocokan didalam corong pisah hingga terbentuk dua lapisan, yakni lapisan etil asetat (fraksi etil asetat : lapisan bagian atas) dan lapisan aquadest (fraksi aquadest : lapisan bagian bawah), dipisahkan lapisan yang terbentuk ke dalam 2 erlenmeyer. Proses penambahan etil asetat pada lapisan aquadest diulang tiga kali dimana lapisan aquadest dibuang, dan lapisan etil asetat yang diperoleh digabungkan menjadi satu di erlenmeyer sebagai fraksi etil asetat.

6. Analisis Alkaloid Total Secara Spektrofotometri UV-Vis

Adapun tahapan analisis alkaloid total dengan metode spektrofotometri visible adalah:

a. Pembuatan larutan *bromocresol green* (BCG) 10^{-4} M

Larutan *bromocresol green* (BCG) dibuat dengan mencampur 69,8 mg *bromocresol green* dengan 3 mL NaOH 2 N dan 5 mL aquades, kemudian dipanaskan pada suhu 50-60°C selama 15 menit hingga larut sempurna. Kemudian larutan campuran diencerkan dengan 1 liter aquades (Patel *et al*, 2015).

b. Pembuatan dapar phospat pH 4,7

Dapar phospat pH 4,7 dibuat sebanyak 500 mL dengan mencampur 16,394 gram natrium phospat (Na_2HPO_4) 0,2 M dengan 19,212 gram

asam sitrat ($C_6H_8O_7$) 0,2 M hingga dihasilkan pH 4,7 (Patel *et al*, 2015).

c. Preparasi larutan induk standar kafein

Larutan induk standar kafein dibuat dengan menimbang 10 mg kafein kemudian dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 100 ml hingga tepat tanda.

d. Penentuan panjang gelombang maksimum

Optimasi panjang gelombang maksimum dilakukan pada standar kafein 10 $\mu\text{g/ml}$ yang telah dipreparasi dengan 5 mL dapar phospat pH 4,7 dan 5 mL Larutan *bromocresol green* (BCG) 10^{-4} M dan diekstraksi dengan 5 mL kloroform sebanyak tiga kali. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200 nm – 400 nm.

e. Penentuan konsentrasi optimum

Penentuan konsentrasi optimum dilakukan pada larutan standar dan larutan sampel dengan konsentrasi 0,1; 10; 25; 50; 75 dan 100 $\mu\text{g/mL}$ yang telah dipreparasi dengan 5 mL dapar phospat pH 4,7 dan 5 mL larutan *bromocresol green* (BCG) 10^{-4} M dan diekstraksi dengan 5 mL kloroform. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum maksimum.

f. Penentuan *operating time*

Larutan induk kafein 100 $\mu\text{g/mL}$ diambil sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan pelarut etanol sampai

tanda batas. Larutan dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum, sampai diperoleh waktu serapan yang stabil.

7. Uji Validasi Metode Analisis

1. Spesifisitas

Frakasi etil asetat daun sirsak dengan konsentrasi 10 ppm dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan etanol sampai tanda 10 mL. Larutan ditambahkan 2 mL HCl, 5 mL BCG, 5 mL dapar phospat pH 4,7 dan dicuci dengan kloroform 5 mL menggunakan corong pisah. Bagian fase kloroform diambil. Larutan dibaca serapannya pada λ maksimal. Spektra yang dihasilkan pada sampel dibandingkan dengan standar kafein.

2. Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan baku kafein, dimana dibuat delapan titik konsentrasi dengan rentang konsentrasi antara 0-200%, diukur pada panjang gelombang maksimum. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat suatu persamaan garis regresi linear dan ditentukan koefisien korelasinya. Kemudian hasil analisis tersebut dapat ditentukan linearitasnya, dengan membandingkan nilai r hitung hasil regresi dengan r tabel pada taraf kepercayaan 95%. Jika r hitung $>$ r

tabel, maka linearitasnya baik dan dapat digunakan untuk perhitungan akurasi dan presisi (Miller, 1993).

3. *Limit Of Detection* dan *Limit Of Quantitation*

Batas deteksi dan batas kuantitasi penetapan kadar alkaloid total dengan menggunakan metode spektrofotometri UV dilakukan dengan membuat sembilan konsentrasi di bawah konsentrasi terkecil pada uji linearitas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai b (*slope*) pada persamaan garis linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residu ($S_{y/x}$). Batas deteksi dapat ditentukan dengan persamaan:

$$Q = 3,3 (SD/SI)$$

Batas kuantitasi dapat ditentukan dengan persamaan:

$$Q = 10 (SD/SI)$$

Dengan Q = batas deteksi / kuantitasi suatu sampel; SI = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis $y = a + bx$); dan SD = simpangan blanko / simpangan baku residual (Harmita, 2004).

4. Akurasi

Uji ketepatan dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku (*Standar addition method*). Uji dilakukan untuk memperoleh nilai persen perolehan kembali dalam penambahan volume larutan uji yang meningkat dalam rentang konsentrasi 80%, 100 % dan 120% pada fraksi etil asetat, dan

diekspresikan dengan menghitung persentase *recovery*. Ketiga sampel tersebut dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum. Hasil pengukuran dibandingkan dengan kurva baku yang telah dibuat dan digunakan untuk menghitung persentase *recovery*. Pengujian akurasi dilakukan dengan 3 kali pengulangan pada masing-masing konsentrasi. *Recovery* dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Recovery} = \text{Kadar terukur} / \text{Kadar sebenarnya} \times 100\%$$

Hasil persentase *recovery* untuk keperluan analisis dikatakan memenuhi syarat jika menunjukkan persentase antara 80- 110% (Ermer, 2005).

5. Presisi

Pengujian presisi yang dilakukan adalah kategori keterulangan (*repeatability*). Pengujian dilakukan membuat larutan standar kafein dengan seri konsentrasi antara 80% - 120% dari konsentrasi uji dibuat sebanyak 6 kali pengulangan. Masing-masing diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV. Ketelitian ditentukan sebagai simpangan baku (SD) atau koefisien variasi (KV). Ketelitian untuk keperluan analisis dikatakan cukup baik jika $KV \leq 2\%$ (Ermer, 2005).

8. Penetapan kadar alkaloid total

Larutan sampel dibuat dengan menimbang 2,5 mg fraksi etil asetat daun sirsak, dilarutkan dalam asam klorida (HCl) 2 N dan kemudian disaring. Selanjutnya ditambahkan 5 mL dapar fosfat pH 4,7 dan 5 mL larutan *bromocresol green* (BCG) 10^{-4} M. Campuran dikocok dan kompleks yang terbentuk diekstraksi dengan 5 mL kloroform sebanyak tiga kali. Lapisan kloroform diambil kemudian dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan kloroform hingga tepat tanda. Pembuatan larutan sampel dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Blanko yaitu semua reagen tanpa larutan ekstrak, kemudian diambil fase kloroformnya. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum. Kadar alkaloid total ditentukan berdasarkan interpolasi absorbansi analit ke dalam persamaan regresi linear standar kafein sehingga didapatkan konsentrasi (x) dalam satuan $\mu\text{g/mL}$. Penetapan kadar alkaloid bisa dihitung menggunakan persamaan regresi $y = bx + a$.

4.5.2 Aplikasi Metode Analisis Pada Penetapan Kadar Alkaloid

Data yang diperoleh merupakan data primer yang didapatkan dari absorbansi larutan pembanding kafein dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan regresi linear. Kadar total dari senyawa dihitung dengan memasukkan kedalam persamaan regresi linear $y = bx + a$, yang diperoleh dari kurva kalibrasi pembanding dan hasilnya dinyatakan dalam satuan %b/b.

BAB V. HASIL PENELITIAN

5.1.Data umum penelitian

5.1.1 Determinasi tanaman

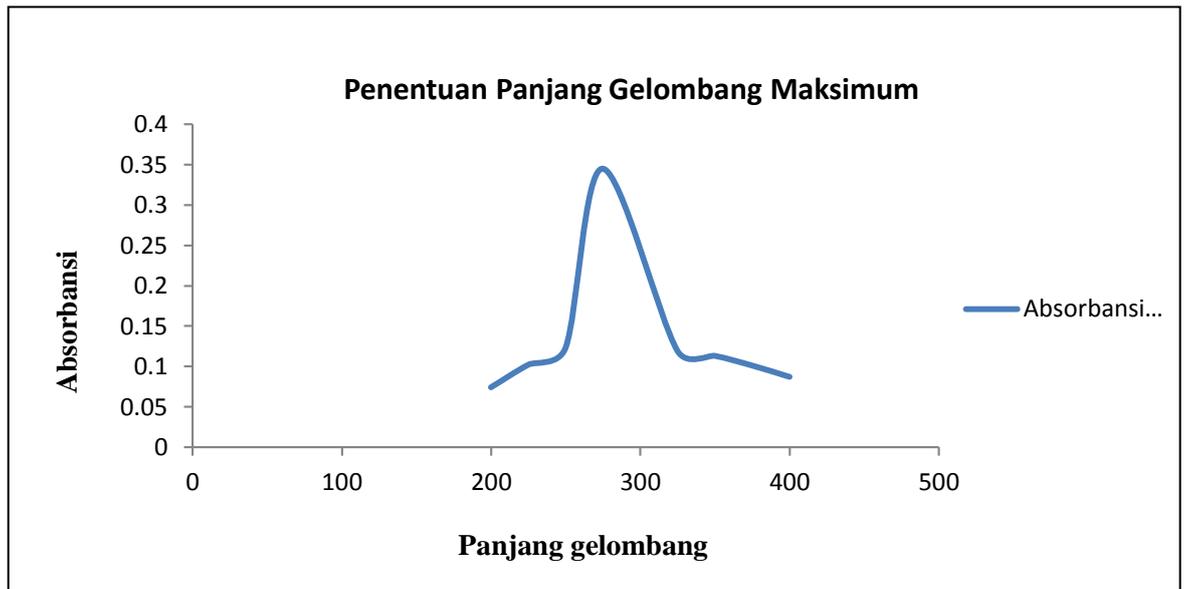
Hasil identifikasi diketahui bahwa tanaman yang digunakan adalah benar daun sirsak (*Annona muricata Linn*). Hasil identifikasi daun sirsak dapat dilihat pada lampiran 1.

5.1.2 Ekstraksi daun sirsak

Maserasi daun sirsak diperoleh ekstrak sebanyak 46,74 gram, sehingga diperoleh nilai rendemen hasil ekstraksi (maserasi) adalah 9,348% b/b, sedangkan hasil fraksi yang diperoleh adalah 1,8802 gram, sehingga diperoleh nilai rendemen hasil fraksinasi adalah 37,604%. Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun sirsak dan fraksi etil asetat daun sirsak dapat dilihat pada lampiran 2.

5.1.3 Penentuan panjang gelombang maksimum

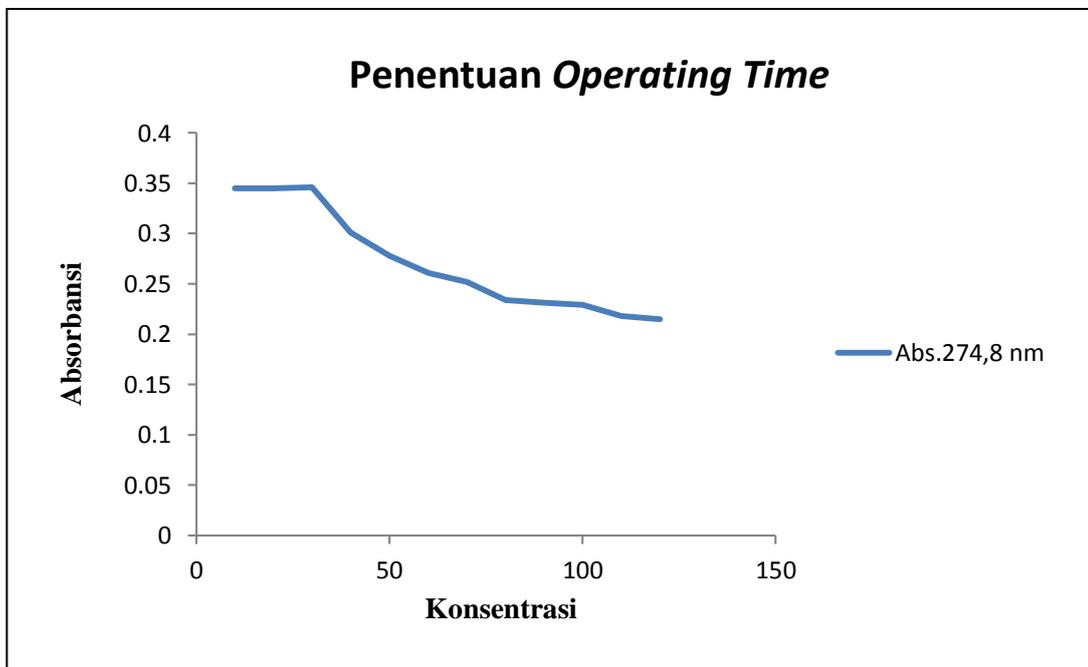
Penentuan panjang gelombang maksimum diperoleh pada panjang gelombang 274,80 nm. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Penentuan panjang gelombang maksimum

5.1.4 Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* diperoleh absorbansi yang stabil pada menit ke-30. Hasil penentuan *operating time* dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. *Operating time*

5.1.5 Penentuan Konsentrasi Optimum

Penentuan konsentrasi optimum didapatkan di konsentrasi standar kafein 10 ppm dan sampel fraksi etil asetat 25 ppm dengan persen akurasi 99,13%. Hasil penentuan konsentrasi optimum dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Penentuan konsentrasi optimum

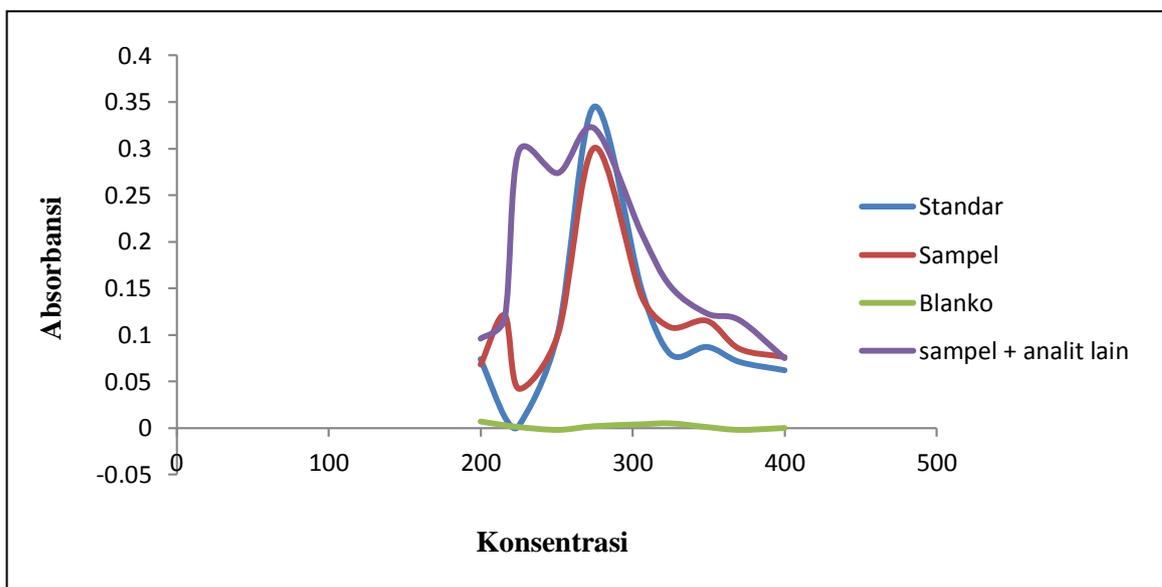
Konsentrasi	Absorbansi	% Akurasi
st. 0,1	0,022	73%
st.10	0,343	37%
st. 25	0,783	43%
st. 50	0,984	66%
st. 75	1,114	83%
st. 100	1,349	91%
sm. 0,1	0,016	4,66%
sm. 10	0,128	37,32%
sm. 25	0,34	99,13%
sm. 50	0,652	66,26%
sm. 75	0,921	117,62%
sm. 100	1,225	110%

5.2. Data khusus penelitian

5.2.1 Validasi Metode Analisis Secara Spektrofotometri Uv-vis

A. Spesifisitas

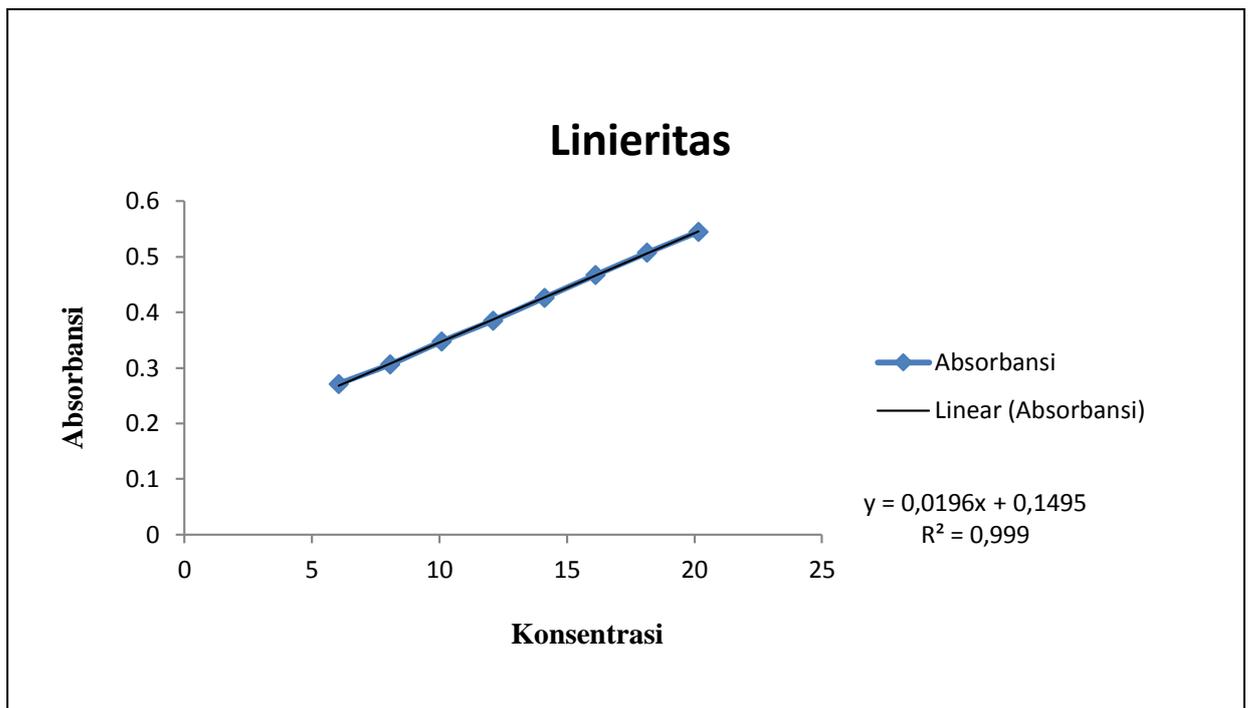
Pengukuran spesifisitas dilakukan dengan membandingkan spektra standar kafein, sampel fraksi etil asetat, dan campuran sampel dengan analit lain pada panjang gelombang 274,80 nm, dan didapatkan absorbansi standar sebesar 0,345, sampel fraksi etil asetat dengan absorbansi 0,301, dan campuran sampel dengan analit lain didapatkan dua peak yaitu pada panjang gelombang 251 nm dengan absorbansi 0,274 dan pada panjang gelombang 274,80 nm dengan absorbansi 0,322. Perbandingan spektra dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Spektra Spesifisitas

B. Linieritas

Uji linieritas menghasilkan persamaan regresi $y = 0,0196x + 0,1495$ dengan nilai $r = 0,99986$ dan $V_{xo} = 0,3773\%$, sehingga larutan standar kafein dengan rentang konsentrasi 0-200 ppm adalah linier. Kurva linieritas standar kafein dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Kurva Linieritas

C. *Limit of detection* dan *Limit of quantitation*

Hasil uji limit deteksi dan limit kuantitasi diperoleh persamaan garis regresi $y = 0,0155x + 0,1775$ dengan nilai $r = 0,9998$. Nilai SD yang diperoleh yaitu 1,3696 sehingga limit deteksi dan limit kuantitasi yaitu 0,0932 ppm dan 0,3106 ppm. Hasil penentuan LOD dan LOQ dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Penentuan LOD & LOQ

Konsentrasi	Absorbansi	y'	y-y'	(y-y') ²
1	0,193	0,1930	-4,4E-05	1,9753E-09
1,5	0,201	0,2008	0,0002	3,5679E-08
2	0,209	0,2086	0,0004	1,7827E-07
2,5	0,216	0,2163	-0,0003	1,1864E-07
3	0,224	0,2241	-0,0001	1,2346E-08
3,5	0,231	0,2319	-0,0009	7,7049E-07
4	0,24	0,2396	0,0004	1,2642E-07
4,5	0,248	0,2474	0,0006	3,4679E-07
5	0,255	0,2552	-0,0002	3,1605E-08
Jumlah				1,6222E-06
$S (y/x)^2$				2,3175E-07
$S (y/x)$				0,0005
LOD				0,0932 ppm
LOQ				0,3106 ppm

D. Akurasi

Hasil uji akurasi ditunjukkan dengan nilai persen recovery, dimana rentang persen recovery menurut AOAC untuk rentang 10 ppm adalah 80-115% sehingga hasil uji akurasi pada penelitian ini dikatakan memenuhi persyaratan persen recovery. Hasil penentuan akurasi ditunjukkan pada tabel 7.

Tabel 7. Penentuan akurasi

Konsentrasi	Absorbansi	Sampel (ppm)	Standar (ppm)	Kadar (ppm)	Rerata	%Recovery	Rerata	SD	% RSD	
80%	0,793	25	8,208	33,2648	33,2474	100,6918	100,4797	0,1314	0,3954	
	0,79			33,1081		98,7827				
	0,795			33,3693		101,9646				
100%	0,831		10,26	10,26	35,2496	35,3541	99,8989	100,9171	0,1045	0,2955
	0,833				35,3540		100,9171			
	0,835				35,4586		101,9353			
120%	0,869		12,312	12,312	37,2345	37,3911	99,3703	100,6430	0,1567	0,4191
	0,875				37,5479		101,9158			
	0,872				37,3912		100,6430			

E. Presisi

Hasil uji presisi diukur kadarnya dengan menggunakan persamaan regresi $y = 0,0191x + 0,1561$ dengan $r = 0,9997$, hasil perhitungan ditunjukkan pada tabel. Penentuan presisi dilakukan replikasi 6 kali pada rentang 80%, 100%, dan 120% . Hasil dari nilai presisi ditunjukkan dengan nilai % RSD yang tidak lebih dari 1,5%. Hasil uji presisi pada penelitian ini memenuhi persyaratan nilai %RSD. Hasil penentuan presisi dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Penentuan presisi

Konsentrasi	Replikasi	Absorbansi	Kadar (ppm)	Rerata	Nilai SD	Nilai %RSD
80%	1	0,793	33,2648	33,2648	0,0874	0,2627
	2	0,79	33,1081			
	3	0,795	33,3693			
	4	0,794	33,3170			
	5	0,793	33,2648			
	6	0,793	33,2648			
100%	1	0,831	35,2496	35,3802	0,0792	0,2239
	2	0,833	35,3541			
	3	0,835	35,4586			
	4	0,835	35,4586			
	5	0,834	35,4063			
	6	0,833	35,3541			
120%	1	0,869	37,2345	37,3651	0,1083	0,2899
	2	0,875	37,5479			
	3	0,872	37,3912			
	4	0,87	37,2867			
	5	0,871	37,3389			
	6	0,872	37,3912			

5.2.2 Penetapan Kadar Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak

Kadar alkaloid total dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi sampel pada persamaan regresi standar kafein $y = 0,0172x + 0,2958$. Hasil penentuan kadar alkaloid total fraksi etil asetat daun sirsak dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Penetapan kadar alkaloid total

Replikasi	Penimbangan (mg)	Absorbansi	Kadar (ppm)	Kadar (mg)	Kadar (%b/b)
1	2,57	0,356	10,75177866	0,107517787	4,183571462
2	2,54	0,353	10,59624202	0,10596242	4,171748826
3	2,62	0,361	11,01100638	0,110110064	4,202674193
Rata-rata					4,18599816

BAB VI. PEMBAHASAN

6.1. Validasi Metode Analisis Secara Spektrofotometri Uv-vis

Validasi metode analisis adalah upaya yang dilakukan melalui percobaan laboratorium untuk membuktikan karakteristik kinerja metode memenuhi aplikasi analisis yang dimaksud (BPOM, 2001). Validasi dilakukan untuk melihat pengaruh dari kondisi peralatan yang digunakan, pereaksi dan personil yang melakukan percobaan. Unites States Pharmacopeia (USP, 2014) telah menyatakan bahwa tidak selamanya parameter untuk mengevaluasi validasi metode harus diuji, sehingga pengujian validasi dari metode analisis fraksi etil asetat daun sirsak, hanya 5 parameter yang diuji, yaitu spesifisitas, linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitas, karena kelima parameter tersebut telah mewakili data yang dibutuhkan untuk uji validasi. Hasil uji validasi dari pengembangan metode analisis fraksi etil asetat daun sirsak dapat dinyatakan dalam beberapa parameter, yaitu:

6.1.1 Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks. (Rohman, 2007).

Pengukuran spesifisitas dilakukan dengan membandingkan spektra standar, sampel fraksi etil asetat, dan campuran sampel dengan analit lain, pada penelitian ini digunakan standar dan sampel dengan hasil optimasi

konsentrasi. Berdasarkan perbandingan spektra standar kafein dan sampel fraksi etil asetat menunjukkan spektra untuk standar kafein memiliki panjang gelombang 274,80 nm dengan absorbansi sebesar 0,345, sampel fraksi etil asetat dengan absorbansi 0,301, dan campuran sampel dengan analit lain didapatkan dua peak yaitu pada panjang gelombang 251 nm dengan absorbansi 0,274 dan pada panjang gelombang 274,80 nm dengan absorbansi 0,322. Berdasarkan hasil perbandingan beberapa spektra menunjukkan kedekatan hasil antara spektra sampel dengan spektra standar yaitu pada panjang gelombang 274,80 nm. Hal ini menunjukkan bahwa dalam sampel mengandung alkaloid sehingga metode analisis memiliki spesifisitas yang baik dalam pengukuran.

6.1.2 Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linieritas harus terdapat dalam rentang metode analisis. Penentuan linieritas dengan cara membuat plot sinyal respon hasil pengukuran sebagai fungsi dari konsentrasi analit, selanjutnya dianalisis secara matematis melalui perhitungan garis regresi.

Parameter hubungan kelinieran yang digunakan yaitu koefisien korelasi (r) dan koefisien determinasi (R) pada analisis regresi linier $y = bx + a$ (b adalah slope, a adalah intersep, x adalah konsentrasi analit dan y adalah respon instrumen). Koefisien determinasi adalah rasio dari variasi yang dijelaskan terhadap variasi keseluruhan. Nilai rasio ini selalu tidak

negatif sehingga ditandai dengan R^2 . Koefisien korelasi adalah suatu ukuran hubungan linier antara dua set data dan ditandai dengan r . Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $a = 0$ dan $r = +1$ atau -1 merupakan hubungan yang sempurna, tanda $+$ dan $-$ bergantung pada arah garis (Riyanto, 2014).

Uji linieritas dilakukan dengan membuat 8 konsentrasi yaitu 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm, 16 ppm, 18 ppm, dan 20 ppm. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi larutan standar kafein yang diukur maka semakin besar pula absorbansi yang diperoleh. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi yang semakin tinggi, tingkat kepekatan senyawa kafein juga semakin tinggi. Selain itu, hukum Lambert-Beer menunjukkan bahwa perubahan konsentrasi suatu sampel tertentu akan mengubah absorbansi pada tiap panjang gelombang dengan suatu faktor yang konstan (Skoog dan West, 1971). Hasil data absorbansi yang diperoleh dihitung menggunakan persamaan garis regresi $y = bx + a$ dan dihitung nilai koefisien korelasi(r). Hasil uji linieritas menghasilkan persamaan garis regresi $y = 0,0196x + 0,1495$ dengan nilai $r = 0,99986$ dan $V_{x0} = 0,3773 \%$ sehingga larutan standar kafein dengan rentang konsentrasi 0-200 ppm adalah linier (Harmita, 2004).

6.1.3 *Limit of detection and Limit of quantification*

LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau dibawah nilai tertentu. Definisi batas deteksi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas deteksi

merupakan kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko (y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko ($3S_b$) (Rohman, 2007). LOQ atau batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan.

LOD dan LOQ ditentukan dengan cara membaca absorbansi larutan standar dengan konsentrasi 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 dan 5 ppm. Kemudian hasil data absorbansi diolah dengan membuat persamaan garis regresi $y = bx + a$. Nilai slope persamaan garis regresi dan s_y (simpangan baku residual) digunakan untuk menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi. Nilai batas deteksi diperoleh dengan mengkalikan nilai S_y dengan konstanta 3 kemudian dibagi nilai slope hasil persamaan garis regresi, sedangkan nilai batas kuantitasi dihitung dengan rumus yang sama namun konstanta diganti dengan 10. Hasil uji batas deteksi dan kuantitasi diperoleh persamaan garis regresi $y = 0,0155x + 0,1775$ dengan nilai $r = 0,9998$. Nilai $S(y/x)$ yang diperoleh yaitu 0,0004814 sehingga batas deteksi yang diperoleh sebesar 0,0932 ppm yang artinya pada konsentrasi tersebut masih dapat dilakukan pengukuran sampel yang memberikan hasil ketelitian suatu alat berdasarkan tingkat akurasi individual hasil analisis. Sedangkan, batas kuantitasi yang diperoleh sebesar 0,3106 ppm yang artinya pada konsentrasi tersebut bila dilakukan pengukuran masih dapat memberikan kecermatan analisis.

6.1.4 Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan.

Uji akurasi dilakukan untuk memperoleh nilai persen perolehan kembali atau % *recovery* analit dalam matriks dan sampel. Pengujian akurasi dilakukan dengan metode *standard addition method* yaitu menganalisis larutan standar dan sampel dengan 3 konsentrasi yang berbeda yaitu 80%, 100%, 120%. Masing-masing konsentrasi direplikasi 3 kali (Indrayanto, 2005). Hasil uji akurasi diukur kadarnya dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi $Y = 0,0191x + 0,1561$ dengan $r = 0,9997$, hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 5.

Nilai akurasi dengan metode *standard addition method* didapatkan nilai % *recovery* sebesar 100,4797%, 100,9171%, 100,6430%, nilai tersebut memenuhi persyaratan % *recovery* yaitu 80-115% untuk kadar 10 µg/g sesuai persyaratan yang ditetapkan AOAC (AOAC, 2013).

6.1.5 Presisi

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran homogen. *Repeatability* adalah salah satu metode untuk menentukan presisi, *repeatability* ini merupakan keseksamaan

metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek.

Penentuan *repeatability* dilakukan dengan cara menganalisis tiga konsentrasi pada akurasi dengan mereplikasi 6 kali. Penentuan presisi dilakukan dengan menganalisis larutan standard addition method dengan konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Nilai presisi dihitung menggunakan standar deviasi (SD) untuk menghasilkan *Relative Standard Deviation* (RSD) atau *Coefficient Variation* (CV). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan nilai $\%RSD \leq 1,5\%$. Semakin kecil nilai standar deviasi yang diperoleh, maka semakin kecil pula nilai koefisien variasinya (Riyadi, 2009). Hasil uji presisi diukur kadarnya dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi $Y = 0,0191x + 0,1561$ dengan $r = 0,9997$. Uji presisi menggunakan metode *repeatability* menghasilkan $\%RSD$ masing-masing 0,2627%, 0,2239%, dan 0,2899%. Uji presisi dengan metode *Repeatability* ini memenuhi syarat $\%RSD \leq 1,5\%$ (AOAC, 2013).

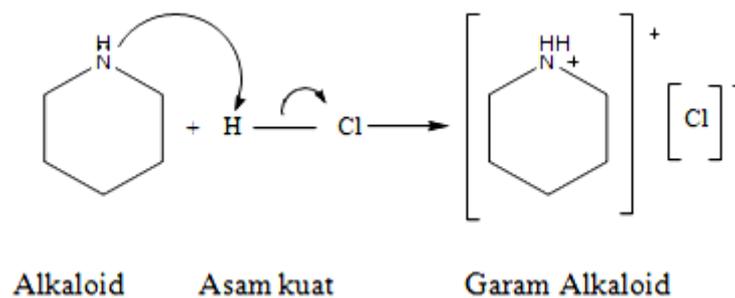
Hasil uji *repeatability* ditunjukkan sebagai berikut :

Penentuan presisi dengan melakukan replikasi 6 kali dari metode standard addition method pada konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Hasil dari nilai presisi ditunjukkan dalam nilai $\% RSD$ yang tidak lebih dari 1,5% (AOAC, 2013).

6.2. Penetapan Kadar Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak

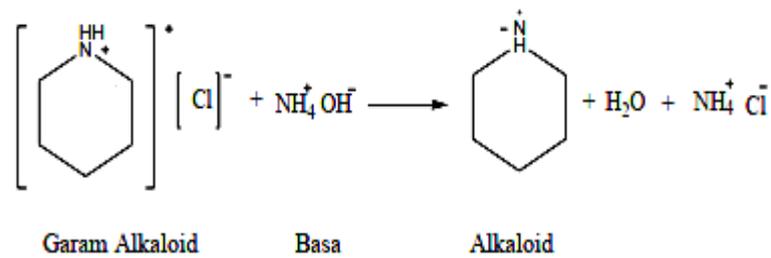
Penetapan kadar alkaloid total pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang

274,80 nm, metode dalam penentuan kadar alkaloid total ini menggunakan larutan standar kafein, dimana standar kafein digunakan sebagai pengidentifikasian total alkaloid dalam tanaman obat itu sendiri. Metode tersebut berdasarkan pada reaksi alkaloid dengan *bromocresol green* (BCG), dan membentuk sebuah olahan berwarna kuning. BCG hanya dapat bereaksi dengan kelas tertentu pada alkaloid yang memiliki atom nitrogen, preparasi penentuan alkaloid total dari fraksi etil asetat daun sirsak yaitu dengan menambahkan HCL 2N untuk menarik senyawa alkaloid dalam fraksi karena alkaloid bersifat basa maka dengan penambahan asam seperti HCL akan terbentuk garam, lalu ditambahkan dapar phospat pH 4,7 untuk mempertahankan pH nya dan ditambah BCG agar pH larutan menjadi basa agar garam alkaloid membentuk basa bebas alkaloid. Adapun reaksi yang terjadi ketika penambahan HCl dapat dilihat pada gambar berikut ini (Robinson, 1995):



Gambar 10. Reaksi alkaloid dengan asam kuat

Lalu ditambah larutan BCG bertujuan agar garam alkaloid membentuk basa bebas alkaloid kembali dan membebaskan alkaloid dari garamnya akibat penambahan asam. Adapun reaksi umum garam alkaloid dengan agen basa dapat dilihat pada gambar berikut ini (Titis dkk, 2013):



Gambar 11. Reaksi pembebasan amina dengan cara pembasaan

Pembuatan kurva kalibrasi standar kafein didapatkan hasil persamaan regresi $y = 0,0172x + 0,2958$, dengan y merupakan nilai absorbansi dan x merupakan nilai konsentrasi. Nilai r hitung adalah 0,999, sedangkan nilai r tabel yang mendekati 1 menunjukkan adanya korelasi yang linier. Hal tersebut menunjukkan bahwa nilai r hitung hampir mendekati nilai r tabel, sehingga dapat dikatakan terdapat korelasi yang baik antara konsentrasi analit dengan absorbansi (Rais, 2014). Penetapan kadar alkaloid total dilakukan pada sampel yang telah dipreparasi dan direplikasi sebanyak 3x.

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan rata-rata kadar alkaloid total dalam fraksi etil asetat daun sirsak adalah sebesar 4,1859%b/b. Perhitungan kadar alkaloid total dalam fraksi etil asetat daun sirsak dapat dilihat pada Lampiran 6. Kadar alkaloid total yang didapatkan pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan penetapan kadar alkaloid total yang dilakukan oleh Wahyuni dkk. (2020) pada ekstrak akar kuning, yakni $0,6939 \pm 0,2439\%$ dalam ekstrak etanol 50%; $0,6607 \pm 0,2117\%$ dalam ekstrak etanol 70%; dan $0,7826 \pm 0,3004\%$ dalam ekstrak etanol 96%. Hal tersebut mungkin dikarenakan ekstrak yang digunakan dalam

penetapan kadar alkaloid total berbeda. Pada penelitian ini digunakan fraksi etil asetat, sedangkan penetapan kadar oleh Wahyuni dkk. (2020) menggunakan ekstrak etanol dengan berbagai variasi konsentrasi. Pada penelitian yang dilakukan Wahyuni dkk (2020) menunjukkan bahwa kandungan alkaloid pada ekstrak etanol akar kuning paling baik tersari dengan menggunakan etanol 96%, sedangkan pada penelitian ini menggunakan fraksi etil asetat daun sirsak didapatkan hasil kadar alkaloid total yang lebih tinggi mungkin dikarenakan pada fraksi etil asetat daun sirsak lebih banyak menarik senyawa alkaloid, terkait dengan prosedur preparasi sampel yang dilakukan pada penelitian juga akan menghilangkan pengaruh dari senyawa selain alkaloid, sehingga hanya kompleks antara BCG dan golongan senyawa alkaloid yang didapatkan pada larutan akhir, dengan adanya kandungan alkaloid dalam fraksi etil asetat daun sirsak, maka daun sirsak memiliki potensi sebagai obat tradisional.

BAB VII. PENUTUP

7.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Hasil validasi metode analisis dalam penentuan kadar alkaloid total dari fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*) memenuhi kriteria validasi metode analisis secara spektrofotometri UV-Vis dengan hasil regresi linier pada uji linieritas adalah $y = 0,0196x + 0,1495$ dan koefisien korelasi (r) 0,9998 dan $V_{x_0} < 2$, spesifisitas yang baik, limit of detection (LOD) adalah 0,0932 ppm dan limit of quantitation (LOQ) adalah 0,3106 ppm, rata-rata hasil uji akurasi dengan konsentrasi 8 ppm memiliki nilai %Recovery = 100,4797% , konsentrasi 10 ppm %Recovery = 100,9171%, dan konsentrasi 12 ppm %Recovery = 100,6430%, sedangkan rata-rata hasil uji presisi dengan konsentrasi 8 ppm nilai SD = 0,0874 dan %RSD = 0,2627%, konsentrasi 10 ppm nilai SD = 0,0792 dan %RSD = 0,2239%, dan konsentrasi 12 ppm nilai SD = 0,1083 dan %RSD = 0,2899%.
2. Kadar alkaloid total dalam fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata L.*) didapatkan kadar rata-rata 4,1859% b/b.

7.2.Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka peneliti dapat memberikan saran pada penelitian ini sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek farmakologi alkaloid pada daun sirsak (*Annona muricata L.*) dalam dunia pengobatan.
2. Perlu dilakukan penentuan kadar alkaloid fraksi etil asetat daun sirsak dengan menggunakan metode lain dan membandingkan hasilnya dengan metode spektrofotometri UV-Vis.
3. Perlu dilakukan penentuan kadar total golongan senyawa lain, seperti flavonoid dan polifenol.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahuja, S. and Dong, M.W., 2005. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, Volume 6, first edition, Elsevier Inc., United Kingdom.
- Aini, N. 2016. Penentuan Kadar Alkaloid Pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode NIR dan Kemometrik. Skripsi. Universitas Jember.
- Andersen, M.O., & Markham, K.P. 2006. Flavonoids: Chemistry, biochemistry, and applications. Boca Raton: Taylor & Francis Goup.
- Anonim. 2013. *Petunjuk Operasional Penerapan CPOB*, 603-623, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Ansel. 2005. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi Edisi keempat*. Jakarta: UI Press.
- AOAC. 2012. Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th ed, USA
- Bahera, S., Ghanty, S., Ahmad, F., Santra, S., Banerjee, S., 2012. UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation, *Analytical & Bioanalytical Techniques*, 3(6): 1-6
- Bobsaid, F.A. 2018. Identifikasi Alkaloid Pada Daun Sirsak. Review Jurnal. Researchgate.
- Chan, C.C., dkk. 2004. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. Canada: John Wiley & Sons
- Day and underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*, Edisi kelima, perbit ANDI, Yogyakarta.
- Departemen Kesehatan. 2002. Keputusan Menteri Kesehatan RI No. 907/MENKES/SK/VII/2002 tentang Syarat-syarat dan Pengawasan Kualitas Air Minum. Jakarta.

- Dirjen Pom. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tanama Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes RI.
- Ditjen POM. 1979. *Farmakope Indonesia*. Edisi Ketiga. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Egan, H. dkk. 1981. *Pearson's Chemical Analysis of Foods*. Eighth Edition. New York: Churchill Livingstone.
- Ermer, J., and Miller, J.H. 2005. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Willey VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim
- Erowid. 2011. *Caffeine Chemistry*. The Vaults of Erowid.
- Evans, T.W. 2002. Albumin As A Drug-Biological Effects Of Albumin Unrelated To Oncotic Pressure. Review Article. *Aliment Pharmacol Ther*. 5: 6-11.
- Faisal, Imam Agus, Mitra Handini, dan Mahyarudin. 2018. Aktivitas Quorum Quenching Bakteri Gram Positif Endofit Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap *Chromobacterium violaceum*. *Naskah Publikasi*. Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura.
- Fatchurrozak., Suranto., sugiyarto. 2013. Pengaruh ketinggian tempat terhadap kandungan vitamin C dan zat antioksidan pada buah *Carica pubescens* di dataran Tinggi Dieng. Pasca Sarjana UNS.
- Garba, S. and S.O. Okeniyi. 2012. Antimicrobial Activities of Total Alkaloids Extracted from Some Nigerian Medicinal Plants, *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 4 (3): 60-63.
- Guether. 1987. *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika*. Jakarta: UI Press.
- Gennaro. 1990. *Remingtons Pharmaceutical Sciences 18 th ed*. Mack Publ. Co, Easton.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*.

- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan Kedua. Bandung: Penerbit ITB.
- Hukmah. 2007. *Metode penelitian kualitatif dan Kuantitatif (5th ed.)* Jakarta: PT Raja.
- Indrayanto, G., dan Yuwono, M. 2005. Validation of Chromatographic Methodes of Analysis. Profiles of Drugs Substances, Excipients and Related Methodology, Volume 32.
- International Conference on Harmonization, 2006. Harmonized Tripartite Guideline Validation on Analytical Procedure : Text and Methodology. International Conference on Harmonization Q2(R1). Genova : International Conference on Harmonization.
- Ikan, R. 1969. *Natural products (a lobaratory Guide)*. Jerusalem: The Hebrew University of Jerusalem.
- John, B., C. T. Sulaiman, S. George, dan V. R. K. Reddy. 2014. Spectrophotometric estimation of total alkaloids in selected justicia species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(5):5–6.
- 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. New Jersey, Humana Press.
- Kar, A. 1996. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Edisi 2. New Delhi: New Age International (P) Ltd., Publishers
- Lenny. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenilpropanida dan Alkaloida*, Karya Ilmiah Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Mardiana, L. 2011. *Ramuan dan Khasiat Daun Sirsak*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Marzuki, Asnah. 2012. *Kimia Analisis Farmasi*. Makassar : Dua Satu Press.

- Miller, J.C., and Miller, J.N. 1993. *Statistics for Analytical Chemistry*, 3rd Ed. John Wiley and Sons. Inc. New York.
- Misra, H., D. Mehta, B.K. Mehta, M. Soni, dan D.C Jain,. 2008. Study of Extraction and HPTLC – UV Method for Estimation of Caffeine in Marketed Tea (*Camellia sinensis*) Granules. *International Journal of Green Pharmacy* 3 (5).
- Mukhriani. 2014. *Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Identifikasi Senyawa Aktif*. Makassar: Jurnal Kesehatan Vol. VII No. 2
- Mulja dan suharman. 1990. *Aplikasi Analisis spektrofotometri UV-Vis*. Surabaya: Moephiso Grafika. H. 1, 13-19,26,27.
- Nurnasari, E. Djumali. 2010. Pengaruh kondisi ketinggian tempat terhadap produksi dan mutu tembakau temanggung.
- Octaviani, T., Guntarti, A., Susanti, H., 2014, Penetapan Kadar β -Karoten pada Beberapa Jenis Cabe (Genus *Capsicum*) dengan Metode Spektrofotometri Tampak, *Pharmaciana*, 4(2): 101-108.
- Padmawinata, K. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: Penerbit ITB (Terjemahan dari Robinson, T. 1991, *The Organic Constituents of Higher Plant*, 6th ed).
- Pangesty, A. 2016. *Uji aktivitas antioksidan dan penetapan kadar fenolik total fraksi etil asetat ekstrak etanol buah buni [*Antidesma bunius* L. (Spreng)] dengan metode 2,2–difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH) dan metode folin-ciocalteu*. Universitas Sanata Dharma.
- Patel, R. K., J. B. Patel, dan P. D. Trivedi. 2015. Spectrophotometric method for the estimation of total alkaloids in the *Tinospora cordifolia* M. and its herbal formulations. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 7(10):249–251.

- Pinem, L, J. 2007. Perbedaan lingkungan masa tanam (*Apium graveolus* L.). Institut Pertanian Bogor.
- Puspita, Carina. 2017. Penetapan Kadar Alkaloid Total Dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Bacillus Cereus* Dari Ekstrak Etanol Daun Kemaitan (*Lunasia amara* Blanco). Skripsi. Program Studi Farmasi Universitas Jember.
- Rais, R.I. (2014). Ekstraksi Andrografolid Dari *Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness Menggunakan Ekstraktor Soxhlet. Jurnal Pharmacia Universitas Ahmad Dahlan, Vol 4 nomor 1.
- Romandanu, rachmawati S.H., dan Lestari S.D. 2014. Antioxidant activity of lotus leaves extract (*Nelumbo nucifera*). Jurnal Fishtech, vol. 3, no. 1, pp. 1-7
- Reinhardt, D., 2009. Caffeine Chemistry and Caffeine Effects.
- Retnani, V. 2011. Pengaruh Suplementasi Ekstrak Daun *Annona muricata* Terhadap Kejadian Displasia Epitel Kelenjar Payudara Tikus Sprague Dawley Yang Diinduksi 7, 12 Dimetilbenz (α) Antracene. Skripsi. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Republik Indonesia, 2016, Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 72 Tahun 2016 tentang Standar Pelayanan Kefarmasian di Rumah Sakit, Jakarta.
- Riyanto, 2014, Validation dan verifikasi metode uji sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi, 21-71, Deepublish, Yogyakarta
- Rohman, A., 2014, *Validasi dan Penjaminan Mutu Metode Analisis Kimia*, 96-107, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Sabirin, M., Hardjono S Dan Respati S., 1994. Pengantar Praktikum Kimia Organik II. Ugm-Yogyakarta.

- Sarker S.D., Zahid L., dan Alexander I.G., 2006. Natural Products Isolation, Humana Press, New Jersey.
- Sendy, A, Y. 2015. Analisis Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Fertilitas Pada Wanita Usia Subur Di Desa Kemiri Kecamatan Panti Kabupaten Jember. Skripsi. Universitas Jember.
- Sertini, F. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Dan Fraksi *n*-Heksan serta Etil Asetat Buah Sawo terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi*. Skripsi. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- Shamsa, F., H. Monsef, R. Ghamooshi, dan V.-R. Mohammadreza. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J. Pharm. Sci.* 32(1):17–20.
- Skoog, D., dan West, D. 1971. Principles of Instrumental Analysis, New York: Holt, Rinehart and Winston, Inc
- Suharta. 2005. Kimia Instrumentasi, Jurusan Kimia FMIPA Unimed, Medan.
- Tanamal, M, T., Papilaya, P, M., Smith, A. 2017. Kandungan Senyawa Flavonoid Pada Daun Melinjo (*Gnetum Gnemon* L.) Berdasarkan Perbedaan Tempat Tumbuh. *Biopendix*.
- Torbeck L.D. 2007. Pharmaceutical And Medical Decice Validation By Eksperimental Design. Informa healthcare. New York.
- Usunobun U., Okolie N. P., Anyanwu O. G. and Adegbeji A.J., 2014. Phytochemical Screening and Proximate Composition of *Annona muricata* Leaves. European Journal of Botany Plant Science and Pathology, Vol.2 No.1, pp. 18-28
- United States Pharmacopeia (USP) Convention. 2017. United States Pharmacopeia (USP) national Formulary 40 NF-35.

- United States Pharmacopeial Convention, 2014. The United States Pharmacopeia 37 –National Formulary 32 (USP37-NF32). 37th edition. Rockville USA : United States Pharmacopeial Convention Inc.
- Venn, R.F. 2008. Principles and Practices of Bioanalysis. Edisi kedua. Prancis: Taylor and Francis Group Ltd. Halaman 23-25.
- Wahyuni septia, Mauritz Pandapotan Marpaun, 2020. Penentuan kadar alkaloid total ekstrak akar kuning (*Fibraurea chloroleuca miers*) berdasarkan perbedaan konsentrasi etanol dengan metode spektrofotometri UV-vis. Jurnal pendidikan kimia dan ilmu kimia, Vol 3 nomor 2.
- Wunas.,Yeanny. and Susanti. 2011. Analisa Kimia Farmasi Kuantitatif. Makassar : Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi UNHAS
- Yahya, Sripatundita. 2015. Spektrofotometer-UV-Vis. Jakarta

Lampiran 1. Surat hasil determinasi tanaman

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
UPT. 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: 083/PL17.8/SP/2020

Menindaklanjuti surat dari Ketua STIKES dr. Soebandi Program Studi S1 Farmasi No: 1942/SDS/U/XI/2020 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Ayu Dwi Wardani
NIM : 17040006
Jur/Fak/PT : Prodi S1 Farmasi/ STIKES dr. Soebandi

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub Kelas: Magnoliidae; Ordo: Magnoliales; Famili: Annonaceae; Genus: Annona; Spesies: Annona muricata, L.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 30 Nopember 2020



Ket. UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu

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

Lampiran 2. Rendemen Ekstrak Etanol 96% Dan Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak

A. Rendemen Ekstrak Etanol 96% Daun Sirsak

Berat serbuk simplisia = 500 gram

Volume etanol = 3000 mL

Berat ekstrak etanol = 46,74 gram

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak etanol}}{\text{Berat serbuk simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{46,74 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 9,348\%\end{aligned}$$

B. Rendemen Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak

Berat ekstrak etanol = 5 gram

Berat fraksi etil asetat = 1,8802 gram

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat fraksi etil asetat}}{\text{Berat ekstrak etanol}} \times 100\% \\ &= \frac{1,8802 \text{ gram}}{5 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 37,604\%\end{aligned}$$

Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan *Bromocresol Green* 10^{-4} dan Dapar Phospat pH 4,7

1. Larutan *Bromocresol Green* 10^{-4} M

a. Pembuatan larutan *Bromocresol Green* 10^{-4} M

$$M = \frac{m/Mr}{V}$$

$$10^{-4} \text{ M} = \frac{m/698,02 \text{ g/mol}}{1 \text{ L}}$$

$$m = 0,0698 \text{ gram} = 69,8 \text{ mg}$$

b. Pembuatan NaOH 2N

$$N = \frac{n}{V} \qquad m = n \times Mr. \text{ NaOH}$$

$$2 \text{ N} = \frac{n}{0,05 \text{ L}} \qquad m = 0,1 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol}$$

$$n = 0,1 \text{ mol} \qquad m = 4 \text{ gram}$$

2. Pembuatan Dapar Phospat pH 4,7

a. Natrium phospat (Na_2HPO_4) 0,2 M

$$M = \frac{m/Mr}{V}$$

$$0,2 \text{ M} = \frac{m/163,94 \text{ g/mol}}{0,5 \text{ L}}$$

$$m = 16,394 \text{ gram}$$

b. Asam sitrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 0,2 M

$$M = \frac{m/Mr}{V}$$

$$0,2 \text{ M} = \frac{m/192,124 \text{ g/mol}}{0,5 \text{ L}}$$

$$m = 19,2124 \text{ gram}$$

Lampiran 4. Pengenceran optimasi konsentrasi

Larutan induk standar kafein 500 ppm = 25,3 mg/50 ml x 1000 ppm = 506 ppm

Pengenceran larutan induk standar kafein 500 ppm

1. $\frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 506 ppm = 101,2 ppm
2. $\frac{1,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 506 ppm = 75,9 ppm
3. $\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 506 ppm = 50,6 ppm
4. $\frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 506 ppm = 25,3 ppm
5. $\frac{0,2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 506 ppm = 10,12 ppm
6. $\frac{0,1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 10,12 ppm = 0,1012 ppm

Larutan induk sampel 500 ppm = 25,1 mg/50 ml x 1000 ppm = 502 ppm

Pengenceran larutan induk sampel

1. $\frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 502 ppm = 100,4 ppm
2. $\frac{1,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 502 ppm = 75,3 ppm
3. $\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 502 ppm = 50,2 ppm
4. $\frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 502 ppm = 25,1 ppm
5. $\frac{0,2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 502 ppm = 10,04 ppm
6. $\frac{0,1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$ x 10,04 ppm = 0,1004 ppm

Lampiran 5. Perhitungan Validasi Metode Analisis

A. Linieritas

1. Larutan induk standar kafein 100 ppm

$$\text{Induk 100 ppm} = 5 \text{ mg}/50 \text{ ml} \times 1000 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm}$$

$$\text{Percobaan} = 5,04 \text{ mg}/50 \text{ ml} \times 1000 \text{ ppm} = 100,8 \text{ ppm}$$

2. Pengenceran larutan induk standar kafein

1. $\frac{0,3 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 100,8 \text{ ppm} = 6,048 \text{ ppm}$

2. $\frac{0,4 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 100,8 \text{ ppm} = 8,064 \text{ ppm}$

3. $\frac{0,5 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 100,8 \text{ ppm} = 10,08 \text{ ppm}$

4. $\frac{0,6 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 100,8 \text{ ppm} = 12,096 \text{ ppm}$

5. $\frac{0,7 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 100,8 \text{ ppm} = 14,112 \text{ ppm}$

6. $\frac{0,8 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 100,8 \text{ ppm} = 16,128 \text{ ppm}$

7. $\frac{0,9 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 100,8 \text{ ppm} = 18,144 \text{ ppm}$

8. $\frac{1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 100,8 \text{ ppm} = 20,16 \text{ ppm}$

3. Perhitungan parameter linieritas

Konsentrasi	Absorbansi
6	0,271
8	0,306
10	0,347
12	0,385
14	0,426
16	0,467
18	0,507
20	0,545

Persamaan regresi linier :

$$y = 0,0196x + 0,1495$$

$$r = 0,99986$$

$$V_{XO} = \frac{S_y/b}{x} \times 100\% = \frac{0,0969/0,0196}{13,104} \times 100\% = 0,3773$$

B. LOD & LOQ

1. Larutan induk standar kafein 100 ppm

$$\begin{aligned} \text{Induk 100 ppm} &= 5 \text{ mg}/50 \text{ ml} \times 1000 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm} \\ &= 5,04 \text{ mg}/50 \text{ ml} \times 1000 \text{ ppm} = 100,8 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\text{Induk 10 ppm} = 5 \text{ ml}/50 \text{ ml} \times 100,8 \text{ ppm} = 10,08 \text{ ppm}$$

2. Pengenceran larutan induk standar kafein

$$1. \frac{0,5 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 10,8 \text{ ppm} = 1,008 \text{ ppm}$$

$$2. \frac{1,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 10,8 \text{ ppm} = 1,512 \text{ ppm}$$

$$3. \frac{1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 10,8 \text{ ppm} = 2,016 \text{ ppm}$$

$$4. \frac{2,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 10,8 \text{ ppm} = 2,52 \text{ ppm}$$

$$5. \frac{1,5 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 10,8 \text{ ppm} = 3,024 \text{ ppm}$$

$$6. \frac{3,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 10,8 \text{ ppm} = 3,528 \text{ ppm}$$

$$7. \frac{2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 10,8 \text{ ppm} = 4,032 \text{ ppm}$$

$$8. \frac{4,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 10,8 \text{ ppm} = 4,536 \text{ ppm}$$

$$9. \frac{2,5 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 10,8 \text{ ppm} = 5,04 \text{ ppm}$$

3. Perhitungan parameter LOD & LOQ

Konsentrasi	Absorbansi
1	0,193
1,5	0,201
2	0,209
2,5	0,216
3	0,224
3,5	0,231
4	0,24
4,5	0,248
5	0,255

Persamaan regresi linier :

$$y = 0,0155x + 0,1775$$

$$r = 0,9998$$

$$S(y/x)^2 = \frac{\sum (y - y')^2}{n-2} = \frac{1,6222E-06}{9-2} = 2,31746E-07$$

$$S(y/x) = \sqrt{2,31746E-07} = 0,0004814$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot S(y/x)}{b} = \frac{3 \cdot 0,0004814}{0,0155} = 0,0932 \text{ ppm}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot S(y/x)}{b} = \frac{10 \cdot 0,0004814}{0,0155} = 0,3106 \text{ ppm}$$

C. Akurasi

1. Preparasi larutan standar adisi

a. Adisi 80%

Sampel fraksi etil asetat daun sirsak = 1,5 mg dalam 50 mL = 25 ppm

Hasil optimasi konsentrasi standar kafein = 10 ppm

Standar 80% = $80/100 * 10 \text{ ppm} = 8 \text{ ppm}$

$8 \text{ ppm} = x/50 \text{ mL} * 100 \text{ ppm} = 4 \text{ mL}$

b. Adisi 100%

Sampel fraksi etil asetat daun sirsak = 1,5 mg dalam 50 mL = 25 ppm

Hasil optimasi konsentrasi standar kafein = 10 ppm

Standar 100% = $100/100 * 10 \text{ ppm} = 10 \text{ ppm}$

$10 \text{ ppm} = x/50 \text{ mL} * 100 \text{ ppm} = 5 \text{ mL}$

c. Adisi 120%

Sampel fraksi etil asetat daun sirsak = 1,5 mg dalam 50 mL = 25 ppm

Hasil optimasi konsentrasi standar kafein = 10 ppm

Standar 120% = $120/100 * 10 \text{ ppm} = 12 \text{ ppm}$

$12 \text{ ppm} = x/50 \text{ mL} * 100 \text{ ppm} = 6 \text{ mL}$

Cara Kerja :

1. Fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 1,5 mg dan dimasukkan ke labu ukur 50 mL, ditambahkan etanol (tidak sampai tanda batas)
2. Pipet 4ml;5ml;6ml larutan standar 100 ppm, masukkan masing-masing standar ke dalam labu ukur 50 mL yang berisi larutan fraksi.
3. Tambahkan etanol sampai tanda batas
4. Sebanyak 5 mL larutan adisi ditambahkan dapar phospat pH 4,7, larutan BCG dan kloroform

Preparasi Akurasi & Presisi	
Larutan Standar Induk 100 ppm = 5 mg/50 mL	
8 ppm	$4\text{ml}/50\text{ml} \times 102,6 \text{ ppm} = 8,208 \text{ ppm}$
10 ppm	$5\text{ml}/50\text{ml} \times 102,6 \text{ ppm} = 10,26 \text{ ppm}$
12 ppm	$6\text{ml}/50\text{ml} \times 102,6 \text{ ppm} = 12,312 \text{ ppm}$

2. Pembuatan kurva baku

a. Larutan induk standar kafein 100 ppm

Induk 100 ppm = $5 \text{ mg}/50 \text{ ml} \times 1000 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm}$

Percobaan = $5,13 \text{ mg}/50 \text{ ml} \times 1000 \text{ ppm} = 102,6 \text{ ppm}$

b. Pengenceran larutan induk standar kafein

1. $\frac{0,3 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 102,6 \text{ ppm} = 6,156 \text{ ppm}$
2. $\frac{0,4 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 102,6 \text{ ppm} = 8,208 \text{ ppm}$
3. $\frac{0,5 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 102,6 \text{ ppm} = 10,26 \text{ ppm}$
4. $\frac{0,6 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 102,6 \text{ ppm} = 12,312 \text{ ppm}$
5. $\frac{0,7 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 102,6 \text{ ppm} = 14,364 \text{ ppm}$
6. $\frac{0,8 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 102,6 \text{ ppm} = 16,416 \text{ ppm}$
7. $\frac{0,9 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 102,6 \text{ ppm} = 18,468 \text{ ppm}$
8. $\frac{1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 102,6 \text{ ppm} = 20,52 \text{ ppm}$

c. Perhitungan parameter akurasi

Konsentrasi	Absorbansi
6	0,278
8	0,311
10	0,351
12	0,392
14	0,428
16	0,47
18	0,513
20	0,549

Persamaan regresi linier :

$$y = 0,0191x + 0,1561$$

$$r = 0,9997$$

A. Perhitungan kadar dalam pengujian akurasi :

- Akurasi 80%

$$x = \frac{0,793 - 0,1561}{0,0191} = 33,2648 \text{ ppm}$$

$$x = \frac{0,790 - 0,1561}{0,0191} = 33,1081 \text{ ppm}$$

$$x = \frac{0,795 - 0,1561}{0,0191} = 33,3693 \text{ ppm}$$

- Akurasi 100%

$$x = \frac{0,831 - 0,1561}{0,0191} = 35,2496 \text{ ppm}$$

$$x = \frac{0,833 - 0,1561}{0,0191} = 35,3541 \text{ ppm}$$

$$x = \frac{0,835 - 0,1561}{0,0191} = 35,4586 \text{ ppm}$$

- Akurasi 120%

$$x = \frac{0,869 - 0,1561}{0,0191} = 37,2345 \text{ ppm}$$

$$x = \frac{0,875 - 0,1561}{0,0191} = 37,5479 \text{ ppm}$$

$$x = \frac{0,872 - 0,1561}{0,0191} = 37,3912 \text{ ppm}$$

B. Perhitungan % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(Cf - Cu)}{Ca}$$

Cf = Konsentrasi total sampel yang diperoleh dari percobaan

Cu = Konsentrasi sampel sebenarnya

Ca = Konsentrasi standar yang ditambahkan

- Akurasi 80%

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(33,2648 - 25)}{8,208} \times 100\% = 100,6918 \%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(33,1081 - 25)}{8,208} \times 100\% = 98,7827 \%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(33,3693 - 25)}{8,208} \times 100\% = 101,9646 \%$$

- Akurasi 100%

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(35,2496 - 25)}{10,26} \times 100\% = 99,8989 \%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(35,3541 - 25)}{10,26} \times 100\% = 100,9171 \%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(35,4586 - 25)}{10,26} \times 100\% = 101,9353 \%$$

- Akurasi 120%

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(37,2345 - 25)}{12,312} \times 100\% = 99,3703 \%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(37,5479 - 25)}{12,312} \times 100\% = 101,9158 \%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(37,3912 - 25)}{12,312} \times 100\% = 100,6430 \%$$

C. Perhitungan standar deviasi

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(P - Pr)^2}{n - 1}}$$

P = Nilai masing-masing pengukuran

Pr = Rerata pengukuran

n = Frekuensi pengukuran

- Akurasi 80%

$$SD = \sqrt{\frac{100,4797}{3-1}} = 0,1314$$

- Akurasi 100%

$$SD = \sqrt{\frac{100,9171}{3-1}} = 0,1045$$

- Akurasi 120%

$$SD = \sqrt{\frac{100,6430}{3-1}} = 0,1567$$

D. Perhitungan standar deviasi relatif :

$$\%RSD = \frac{SD}{Pr} \times 100\%$$

SD = Standar deviasi

Pr = Rerata pengukuran

- Akurasi 80%

$$\%RSD = \frac{0,1314}{33,2474} \times 100\% = 0,3954\%$$

- Akurasi 100%

$$\%RSD = \frac{0,1045}{35,3541} \times 100\% = 0,2955\%$$

- Akurasi 120%

$$\%RSD = \frac{0,1567}{37,3912} \times 100\% = 0,4191\%$$

Lampiran 6. Perhitungan Kadar Alkaloid Total

Replikasi	Penimbangan (mg)	Absorbansi
1	2,57	0,356
2	2,54	0,353
3	2,62	0,361

1. Replikasi 1

$$Y = 0,0193x + 0,1486$$

$$0,356 = 0,0193x + 0,1486$$

$$X = \frac{0,356 - 0,1486}{0,0193}$$

$$X = 10,7518 \text{ ppm}$$

$$\text{Larutan sampel dalam } 10 \text{ mL} = \frac{10,7518 \text{ ppm}}{1 \text{ mL} \times 1000} \times 10 \text{ mL} = 0,1075 \text{ mg}$$

$$\% \text{ b/b} = \frac{0,1075 \text{ mg}}{2,57 \text{ mg}} \times 100\%$$

$$= 4,1829\% \text{ b/b}$$

2. Replikasi 2

$$Y = 0,0193x + 0,1486$$

$$0,353 = 0,0193x + 0,1486$$

$$X = \frac{0,353 - 0,1486}{0,0193}$$

$$X = 10,5962 \text{ ppm}$$

$$\text{Larutan sampel dalam } 10 \text{ mL} = \frac{10,5962 \text{ ppm}}{1 \text{ mL} \times 1000} \times 10 \text{ mL} = 0,1059 \text{ mg}$$

$$\% \text{ b/b} = \frac{0,1059 \text{ mg}}{2,54 \text{ mg}} \times 100\%$$

$$= 4,1693\% \text{ b/b}$$

3. Replikasi 3

$$Y = 0,0193x + 0,1486$$

$$0,361 = 0,0193x + 0,1486$$

$$X = \frac{0,361 - 0,1486}{0,0193}$$

$$X = 11,0110 \text{ ppm}$$

$$\text{Larutan sampel dalam } 10 \text{ mL} = \frac{11,0110 \text{ ppm}}{1 \text{ mL} \times 1000} \times 10 \text{ mL} = 0,1101 \text{ mg}$$

$$\% \text{ b/b} = \frac{0,1101}{2,62} \times 100\%$$

$$= 4,2027\% \text{ b/b}$$

$$\text{Rata-rata } \% \text{ b/b} = \frac{4,1829\% + 4,1693\% + 4,2027\%}{3} = 4,1859\% \text{ b/b}$$

Lampiran 7. Jadwal kegiatan penelitian

No.	Kegiatan	Februari				Maret				April			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1.	Tahap Persiapan	■											
	a. Pengumpulan bahan baku	■											
	b. Pembuatan simplisia		■	■									
2.	Tahap Pelaksanaan				■								
	a. Ekstraksi				■	■							
	b. Preparasi larutan						■	■	■				
	c. Validasi metode						■	■					
	d. Penetapan kadar								■				
3.	Tahap Penyusunan Laporan									■			
	a. Penyusunan laporan									■	■	■	
	b. Seminar hasil												■