

**ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR KAFEIN DENGAN
EKSTRAK METANOL PADA SAMPEL TEH HITAM DARI PTPN
XII LAWANG JAWA TIMUR MENGGUNAKAN KLT-
DENSITOMETRI**

SKRIPSI



Oleh :
Reza Diar Milanda
NIM. 17040082

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

**ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR KAFEIN DENGAN
EKSTRAK METANOL PADA SAMPEL TEH HITAM DARI PTPN
XII LAWANG JAWA TIMUR MENGGUNAKAN KLT-
DENSITOMETRI**

SKRIPSI

Untuk memenuhi persyaratan
memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)



Oleh :
Reza Diar Milanda
NIM. 17040082

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

MOTTO

من جَدَّ وَجَدَ

(siapa yang bersungguh-sungguh, maka ia akan mendapatkannya)

“Keberhasilan itu hanya bisa dilakukan oleh diri sendiri bukan orang lain”

“The only mistake in life is the lesson not learned”

“Skripsi ini aku persembahkan untuk Bapak Joko Sugiarto dan Ibu Kariyati, Adik-adikku, keponakanku, saudaraku dan keluarga besarku serta orang-orang yang aku cintai dan sayangi”

“Skripsi ini aku persembahkan untuk segenap dosen farmasi serta laboran yang sudah membantu penelitian saya selama di laboratorium, untuk sahabatku, teman-teman farmasi 17B dan 17A, serta teman-teman seangkatan tahun 2017 Universitas dr. Soebandi ”

LEMBAR PERSETUJUAN

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

Jember, 17 Agustus 2021

Pembimbing I

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

Pembimbing II

apt. Lindawati Setyaningrum, M. Farm
NIDN. 0703068903

HALAMAN PENGESAHAN

Tugas akhir yang berjudul *Analisis Dan Penetapan Kadar Kafein Dengan Ekstrak Metanol Pada Sampel Teh Hitam Dari PTPN XII Lawang Jawa Timur Menggunakan KLT-Densitometri* telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada :

hari : Selasa

tanggal : 17 Agustus 2021

tempat : Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi Jember

Tim penguji
Ketua,

Gumiarti, S. ST., MPH
NIDN. 4005076201

Penguji II,

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

Penguji III,

apt. Lindawati S., M. Farm
NIDN. 0703068903



HALAMAN PERNYATAAN ORIGINALITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Reza Diar Milanda

NIM : 17040082

Program Studi : Sarjana Farmasi

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi saya yang berjudul “Analisis Dan Penetapan Kadar Kafein Dengan Ekstrak Metanol Pada Sampel Teh Hitam Dari PTPN XII Lawang Jawa Timur Menggunakan KLT-Densitometri” adalah benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Jember, 16 September 2021



SKRIPSI

ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR KAFEIN DENGAN EKSTRAK METANOL PADA SAMPEL TEH HITAM DARI PTPN XII LAWANG JAWA TIMUR MENGGUNAKAN KLT-DENSITOMETRI

oleh :

**Reza Diar Milanda
NIM. 17040082**

Pembimbing

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

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

ABSTRAK

Milanda, Reza Diar,* Puspaningtyas, Ayik Rosita,** Setyaningrum, Lindawati,***.2021. **Analisis Dan Penetapan Kadar Kafein Dengan Ekstrak Metanol Pada Sampel Teh Hitam Dari PTPN XII Lawang Jawa Timur Menggunakan KLT-Densitometri.** Skripsi. Program Studi Farmasi Universitas dr. Soebandi.

Teh hitam memiliki kandungan kafein yang cukup tinggi. Kafein merupakan senyawa alkaloid yang dapat ditemukan salah satunya pada teh hitam. Efek farmakologi dari adanya kelebihan kafein akan mempengaruhi sistem saraf pusat, jantung, perifer, ginjal, gastrointestinal serta sistem pernafasan. Mengkonsumsi kafein > 200 mg/hari dapat menyebabkan insomnia dan sakit kepala. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui optimasi kondisi analisis KLT Densitometri serta penetapan kadar kafein pada teh hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur. Penelitian ini merupakan *True Experimental Laboratories* dengan sampel teh hitam dengan analisis menggunakan metode KLT Densitometri serta *software* visionCATS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa optimasi kondisi analisis berupa fase gerak kloroform:etanol (99:1)v/v, konsentrasi 400; 600; 800; 1000; 1200; 1400 ppm, serta panjang gelombang maksimum 275 nm. Koefisien korelasi antara luas area vs konsentrasi sebesar (r) 0,991 serta persamaan regresi $y = 8,6622 \times 10^{-6} \cdot X + 6,7632 \times 10^3$. Mean serta SD kadar kafein ($0,61458 \pm 0,259$). Dapat disimpulkan bahwa kadar kafein dalam ekstrak metanol daun teh hitam setiap 20 mg mengandung 0,61458 mg kafein. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai validasi metode analisis KLT-Densitometri terkait dengan analisis dan penetapan kadar kafein dalam sampel lain.

Kata Kunci: kafein, teh hitam, KLT Densitometri, penetapan kadar

* Peneliti

** Pembimbing 1

*** Pembimbing 2

ABSTRACT

Milanda, Reza Diar,* Puspaningtyas, Ayik Rosita,** Setyaningrum, Lindawati,***.
2021. Analysis and Determination of Caffeine Levels with Methanol Extract in Black Tea Samples from PTPN XII Lawang, East Java Using TLC-Densitometry. Essay. University Pharmacy Study Program dr. Soebandi.

Black tea has a fairly high caffeine content. Caffeine is an alkaloid compound that can be found in black tea. Pharmacological effects of excess caffeine will affect the central nervous system, heart, peripheral, kidney, gastrointestinal and respiratory systems. Consuming caffeine > 200 mg/day can cause insomnia and headaches. This study aims to determine the optimization conditions of TLC Densitometry analysis and determination of caffeine content in black tea from PTPN XII Lawang, East Java. This research is a *True Experimental Laboratories* with black tea samples analyzed using TLC Densitometry method and *software* visionCATS. The results showed that the optimization of the analytical conditions in the form of mobile phase chloroform:ethanol (99:1)v/v, concentration 400; 600; 800; 1000; 1200; 1400 ppm, and a maximum wavelength of 275 nm. The correlation coefficient between area vs concentration is (*r*) 0.991 and the regression equation $y = 8.6622 \times 10^{-6} \cdot X + 6.7632 \times 10^{-3}$. Mean and SD of caffeine content (0.61458 ± 0.259). It can be concluded that the caffeine content in the methanol extract of black tea leaves every 20 mg contains 0.61458 mg of caffeine. There is a need for further research on the validation of the TLC-Densitometry analysis method related to the analysis and determination of caffeine levels in other samples.

Keywords: caffeine, black tea, TLC Densitometry, assay

* Author

** Advisor 1

*** Advisor 2

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji dan syukur kepada Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya semata sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan menyelesaikan pendidikan Program Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember dengan judul “Analisis Dan Penetapan Kadar Kafein Dengan Ekstrak Metanol Pada Sampel Teh Hitam Dari PTPN XII Lawang Jawa Timur Menggunakan KLT-Densitometri“.

Penyusunannya dapat terlaksana dengan baik berkat dukungan dan bimbingan dari banyak pihak. Untuk itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Drs. Said Mardijanto, S. Kep., MM selaku Rektor Universitas dr. Soebandi
2. Hella Meldy Tursina, S. Kep., Ns., M. Kep selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
3. apt. Dhina Ayu Susanti, S. Farm.,M. Kes selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi
4. Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M. Farm selaku pembimbing 1
5. apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku pembimbing 2
6. Gumiarti, S. ST., MPH sebagai penguji

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

Jember, 17 Agustus 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN JUDUL DALAM	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
LEMBAR PERSETUJUAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
HALAMAN PERNYATAAN ORIGINALITAS.....	vi
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	10
1.3 Tujuan	10
1.3.1 Tujuan Umum	10
1.3.2 Tujuan Khusus	10
1.4 Manfaat Penelitian	11
1.4.1 Secara Teoritis	11

1.4.2 Secara Praktis.....	11
1.5 Keaslian Penelitian	11
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	12
 2.1 Teh	12
2.1.1 Tanaman Teh	12
2.1.2 Jenis Teh Berdasarkan Proses Pengolahan	14
 2.2 Teh Hitam	16
 2.3 Kafein	19
 2.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	21
2.4.1 Sistem Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	26
2.4.2 Densitometri.....	27
 2.5 Ekstraksi.....	29
2.5.1 Tujuan ekstraksi.....	29
2.5.2 Jenis ekstraksi	30
2.5.3 Cara-cara ekstraksi.....	30
 2.6 Tinjauan pelarut metanol	33
 2.7 Uji Fitokimia	35
BAB 3. KERANGKA KONSEP.....	37
 3.1. Kerangka Konsep	37
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	38
 4.1 Desain Penelitian	38
 4.2 Populasi	38
 4.3 Sampel	38

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	38
4.5 Definisi Operasional	39
4.6 Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data	40
4.6.1 Optimasi kafein menggunakan KLT-Densitometri	41
4.6.2 Penetapan kadar kafein menggunakan KLT-Densitometri.....	42
BAB 5. HASIL PENELITIAN	45
5.1 Data umum.....	45
5.2 Data khusus.....	47
5.2.1 Optimasi kondisi analisis kafein ekstrak metanol teh hitam.....	47
5.2.2 Penetapan kadar kafein ekstrak metanol teh hitam.....	49
BAB 6. PEMBAHASAN PENELITIAN	51
6.1 Optimasi kondisi analisis kafein ekstrak metanol teh hitam	51
6.1.1 Optimasi konsentrasi.....	52
6.1.2 Optimasi panjang gelombang maksimum.....	53
6.1.3 Optimasi fase gerak	54
6.2 Penetapan kadar kafein ekstrak metanol teh hitam	54
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	62
7.1 Kesimpulan	62
7.2 Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN.....	68

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Keaslian penelitian.....	11
Tabel 2.1 Komposisi senyawa dalam teh hitam.....	18
Tabel 2.2 Konstanta dielektrikum pelarut organik.....	34
Tabel 4.1 Definisi operasional	39
Tabel 5.1 Hasil ekstraksi maserasi metanol teh hitam	45
Tabel 5.2 Luas area dan nilai Rf standar dengan sampel	47
Tabel 5.3 Hasil pengukuran kadar kafein	50
Tabel 6.1 Data jenis tanah (Setyamidjaja,2000)	61

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman teh	12
Gambar 2.2 Struktur kimia kafein.....	20
Gambar 3.1 Kerangka konsep	37
Gambar 5.1 Skrinning kimia sampel.....	45
Gambar 5.2 Kurva baku kafein	46
Gambar 5.3 Fase gerak kloroform : metanol (19:1) v/v.....	47
Gambar 5.4 Fase gerak etil asetat : metanol : air (100: 13,5: 10) v/v	48
Gambar 5.5 Hasil penotolan larutan standar dan sampel pada lempeng KLT	48
Gambar 5.6 Panjang gelombang maksimum 275 nm	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal penyusunan naskah skripsi	68
Lampiran 2. Dokumentasi penelitian	69
Lampiran 3. Perhitungan ekstraksi maserasi.....	71
Lampiran 4. Perhitungan optimasi konsentrasi kurva baku	72
Lampiran 5. Perhitungan penetapan kadar kafein ekstrak metanol teh hitam	73
Lampiran 6. Kurva baku kafein	76
Lampiran 7. Panjang gelombang maksimum kafein.....	77
Lampiran 8. Hasil output dari KLT Densitometri.....	78

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sektor pertanian, kehutanan, dan perikanan mempunyai peranan penting dalam kegiatan perekonomian Indonesia, hal ini dapat dilihat dari kontribusinya terhadap Produk Domestik Bruto (PDB) yang cukup besar yaitu sekitar 12,81% pada tahun 2018. Pada waktu krisis ekonomi, sektor pertanian merupakan sektor yang cukup kuat menghadapi goncangan ekonomi dan ternyata dapat diandalkan dalam pemulihan perekonomian nasional. Salah satu sub sektor yang cukup besar potensinya adalah sub sektor perkebunan. Kontribusi sub sektor perkebunan dalam PDB yaitu sekitar 3,30% pada tahun 2018. Sub sektor ini merupakan penyedia bahan baku untuk sektor industri, penyerap tenaga kerja, dan penghasil devisa (Soekartawi, 1996).

Di Indonesia tanaman teh ditanam sebagai tanaman perkebunan pada ketinggian 700 – 2.000 m dpl. Di negara tropis seperti Indonesia, teh diperoleh sepanjang tahun dengan gilir petik 6 – 12 hari. Tanaman teh bila dibiarkan tumbuh dapat mencapai 15 m, tetapi di perkebunan tingginya dipertahankan sekitar 70 – 150 cm. Iklim yang sesuai untuk tanaman teh adalah curah hujan minimum 2.000 mm dan merata sepanjang tahun dengan suhu 11^0 C – 25^0 C disamping tingkat kesuburan tanah yang baik (Anonim, 2010).

Perkebunan teh di Indonesia berdasarkan tinggi tempat dibedakan menjadi 3 golongan, yaitu : Perkebunan daerah rendah, yaitu kebun-kebun pada ketinggian di bawah 800 m dpl dengan suhu rata-rata $23,86^0$ C. Perkebunan daerah sedang, yaitu kebun-kebun pada ketinggian antara 800 – 1.200 m dpl

dengan suhu rata-rata $21,21^{\circ}\text{C}$. Perkebunan daerah tinggi, yaitu kebun-kebun pada ketinggian di atas 1.200 m dpl dengan suhu rata-rata $18,98^{\circ}\text{C}$ (Schoorel, 1974).

Kebun Teh Wonosari terletak di desa Toyomarto Kecamatan Singosari, Kabupaten Daerah Tingkat II Malang dan berada di jalan poros Surabaya – Malang. Lokasi Kebun Teh Wonosari tepatnya berjarak 6 km dari kota Lawang, 30 km dari kota Malang, dan 80 km dari kota Surabaya. Kebun Teh Wonosari Lawang terletak pada ketinggian 950-1.250 mdpl, dengan pabriknya yang berada pada ketinggian 950 meter. Menurut komoditinya, terbagi menjadi dua yaitu: (1) Kebun Wonosari Lawang dengan budidaya teh (2) Afdeling Randu Agung dan Gebug Utara, dengan budidaya randu, sirsak dan mangga. Kebun dan Pabrik Teh Wonosari merupakan agrobisnis dan agrowisata yang sangat membantu negara dalam ekspor produk jadi dan dapat menambah devisa negara. Tempat PTPN XII yang berada di bawah lereng Gunung Arjuna memiliki tempat yang sangat cocok untuk memproduksi teh terbaik yang dapat bersaing dengan teh terbaik dunia. Selain memproduksi teh, PTPN XII Wonosari juga memproduksi kopi, kakao, dan karet. Selain komoditi di atas, PTPN XII (persero) juga membudidayakan kayu dan tanaman semusim lainnya (Alfiansyah, 2021:56).

Industri teh merupakan salah satu industri yang memiliki produk dengan daya tarik yang tinggi di beberapa negara. Perkebunan teh Wonosari merupakan perkebunan teh yang berada di bawah naungan PT. Perkebunan Nusantara XII (Persero) yang terletak di kota Lawang. Perkebunan teh ini,

menghasilkan produk berupa teh hitam yang di ekspor ke berbagai negara seperti Eropa, Australia, Amerika, Timur Tengah, dan Asia Tenggara (M. Januar et al, 2014). Perkebunan teh Wonosari dikenal sebagai tempat teh berkualitas di daerah Kabupaten Malang Jawa Timur. Pada perkebunan ini telah dilakukan perbaikan yang meliputi peningkatan produktivitas kebun pengolahan teh, penghijauan kawasan yang rusak, serta pengembangan kawasan kebun sebagai agro wisata (Baskara, 2005).

Pada masyarakat didaerah tertentu, seduhan teh diyakini bermanfaat sebagai obat kuat dan membuat awet muda (Arif Hartoyo, 2003). Adapun jenis teh yang umumnya dikenal dalam masyarakat adalah teh hijau, teh oolong, teh hitam, dan teh putih (Ajisaka, 2012).

Teh mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder terutama bagian daun. Kandungan kimia daun teh sangat bervariasi tergantung pada musim, kondisi tanah, perlakuan kultur teknis, umur daun, dan banyaknya sinar matahari yang diterima (Pusat Penelitian Teh dan Kina [PPTK], 2008). Berdasarkan proses pengolahannya terdapat beberapa jenis teh salah satunya teh hitam. Teh hitam adalah jenis teh yang dibuat melalui proses pelayuan, penggilingan, oksimatis, dan pengeringan. Teh hitam memiliki kandungan kafein yang cukup tinggi daripada teh hijau (Rohdiana, 2015). Konsumsi teh melebihi dua cangkir per hari sangat beresiko terhadap kesehatan peminumnya sebab teh mengandung 40-100 mg kafein per cangkir. Kandungan kafein pada teh dalam 100 gram terdapat 2,5-4,5% kafein atau kandungan kafein berkisar 20-90 mg khusus pada teh hitam atau sekitar 8-

11% berat kering untuk 40 mg kafein per 235 ml cangkir. Berdasarkan FDA (*Food Drug Adminstration*) yang diizinkan adalah 100-200 mg/hari, sedangkan menurut SNI 01-7152-2006 bahwa batas maksimum kafein dalam makanan dan minuman adalah 150 mg/hari. Efek farmakologi dari adanya kelebihan kafein akan mempengaruhi sistem saraf pusat, jantung, perifer, pusat vaskulator, ginjal, gastrointestinal serta sistem pernafasan. Akan tetapi jika dimanfaatkan dengan kadar yang sesuai maka kafein berguna untuk anti hipertensi, anti inflamasi, anti obesitas, hipokolesterolemia, dan anti diabetes. Keberadaan alkaloid biasanya sebagai garam organik dalam tumbuhan dalam bentuk senyawa padat berbentuk kristal dan kebanyakan berwarna. Pada daun atau buah segar biasanya keberadaan memberikan rasa pahit (Simbala, 2009). Kafein merupakan alkaloid putih dengan rumus senyawa kimia $C_8H_{10}N_4O_2$ dan rumus bangun 1,3,5 – *trimethylxanthyn* (Isnindar et al., 2016).

Kafein memiliki efek farmakologi sebagai stimulant dari sistem saraf pusat dan metabolisme, digunakan secara baik untuk pengobatan dalam mengurangi kelelahan fisik dan juga dapat meningkatkan tingkat kewaspadaan sehingga rasa kantuk dapat ditekan. Kafein juga merangsang sistem saraf pusat dengan cara menaikkan tingkat kewaspadaan, sehingga fikiran lebih jelas dan terfokus dan koordinasi badan menjadi lebih baik. Konsumsi kafein secara rutin dapat menyebabkan terjadinya toleransi. Tanda-tanda dan gejala-gejala dari konsumsi kafein secara berlebihan antara lain kecemasan, insomnia, wajah memerah, diuresis, gangguan saluran cerna, kejang otot, takikardia, aritmia, peningkatan energi, dan agitasi psikomotor. Kafein dapat

berinteraksi dengan siprofloksasin dimana mengakibatkan terjadinya penurunan metabolisme hepatis kafein sehingga efek farmakologi kafein dapat meningkat (Sukandar dkk, 2008).

Adanya perbedaan kadar dalam ketinggian tempat tanam yang berbeda dapat disebabkan oleh berbagai faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Lokasi tanam akan berpengaruh pada suhu udara, sinar matahari, kelembapan udara, dan angin. Unsur-unsur ini sangat berpengaruh terhadap proses pertumbuhan tanaman. Semakin tinggi suatu tempat semakin rendah suhu udaranya, dan sebaliknya semakin rendah suatu tempat atau lokasi tanam maka suhu yang terdapat dilokasi tersebut semakin tinggi (Kusumayadi dkk, 2013).

Jumlah kafein yang terkandung didalam teh tergantung pada berbagai faktor seperti jenis daun teh, tempat tumbuhnya tanaman teh, ukuran partikel teh, serta metode dan lamanya waktu penyeduhan. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa lokasi perkebunan teh mempengaruhi kadar kafein pada daun teh tersebut (Mokhtar dan Ahmed, 2000).

Pada tempat tanam yang tinggi intensitas cahaya matahari berkurang, cahaya matahari mempengaruhi tumbuhan berdaun hijau karena cahaya matahari sangat menentukan proses fotosintesis. Fotosintesis adalah proses dasar pada tumbuhan untuk menghasilkan makanan. Makanan yang dihasilkan akan menentukan ketersediaan energi untuk pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan (Aryulina dkk, 2006). Proses fotosintesis yang kurang sempurna mempengaruhi kadar metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman, salah

satunya adalah kafein. Kafein merupakan produk sekunder dari proses metabolisme tanaman, semakin tingginya laju fotosintesis maka kafein yang dihasilkan akan semakin tinggi (Erdiansyah dan Yusianto, 2012).

Cara mendapatkan kafein salah satunya adalah dengan ekstraksi. Ekstraksi adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan senyawa organik dari campuran senyawa. Teknik ini secara selektif melarutkan satu atau lebih senyawa pada pelarut yang sesuai. Larutan dari senyawa terlarut ini disebut sebagai ekstrak (Aniket Chaugule, dkk., 2019). Menurut Ms. R. R. Shinde, dkk (2017) meskipun air hampir selalu merupakan salah satu cairan pelarut dalam proses ekstraksi cair-cair, namun pilihan pelarut organik cukup luas.

Salah satu teknik ekstraksi yang dapat digunakan adalah maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena melalui 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 pengekstrak untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi melalui cara memerhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut (Darwis, 2000).

Proses ekstraksi dapat berlangsung dengan sempurna apabila digunakan cairan penyari yang sesuai. Kafein dalam daun teh berbentuk basa bebas sehingga dapat larut dalam pelarut organik. Salah satu pelarut organik yang

dapat melarutkan kafein adalah metanol sehingga metanol digunakan sebagai cairan penyari (Dharma, 2010). Kafein memiliki gugus kromofor dalam strukturnya. Berdasarkan gugus kromofor dalam struktur kafein yang bertanggung jawab atas penyerapan energi radiasi sinar UV, maka untuk identifikasi kuantitatif kandungan kafein digunakan metode KLT-densitometri (Dharma, 2010).

Metode yang banyak digunakan untuk penetapan kadar adalah KLT-Densitometri (Sugihartini, et al., 2012). Untuk analisis maupun kontrol kualitas dilaboratorium banyak menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. Hal ini karena mudah dilakukan, reagen yang digunakan sensitif dan selektif. Untuk penetapan kadar dapat menggunakan kombinasi KLT dan Densitometri (KLT-Densitometri). Apabila dibandingkan dengan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi), KLT fase gerak yang digunakan tidak ada batasan, sampel suspensi atau keruh dapat ditetapkan kadarnya secara langsung, cepat, ekonomis, dan memungkinkan terjadinya secara simultan (Yuangsoi, et al., 2008).

Metode densitometri memiliki kelebihan yaitu spesifikasi yang tinggi, dapat dilakukan dengan mudah serta cepat, pemilihan fase gerak memberikan fleksibilitas yang besar, dalam melakukan optimasi pemisahan dapat dilakukan dengan berbagai macam teknik, biaya yang dikeluarkan dalam pengoperasian relatif murah salah satunya karena pelarut yang digunakan sedikit dan silika gel sebagai fase diam, serta mengubah polaritas pelarut dengan pelarut campuran dapat dilakukan dalam waktu singkat. Setelah

dibandingkan antara metode KCKT dengan metode KLT, metode KLT lebih mudah serta murah dalam pelaksanaannya, dan sederhana penggunaan peralatannya. Serta pada proses deteksi bersifat lebih statis jika menggunakan KLT sedangkan bersifat dinamis dengan menggunakan KCKT (Abdul, 2009). Pada penelitian ini akan dilakukan analisis dan penetapan kadar kafein dengan ekstrak metanol dengan metode maserasi pada sampel teh hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur menggunakan KLT-Densitometri, secara kualitatif maupun kuantitatif.

Berdasarkan penelitian pada jurnal penetapan kadar konsumsi kafein dalam minuman teh seduhan yang beredar di pasaran secara KLT-Densitometri ditentukan kadar konsumsi kafein pada produk teh celup dengan menggunakan metode KLT-Densitometri. Kafein di ekstraksi dengan cara penyajian biasa yaitu diseduh dengan 250 mL air panas selama 2 menit sambil diaduk. Kemudian larutan teh disaring melalui corong dengan menggunakan kertas saring. Filtrat dipindahkan ke corong pisah, selanjutnya difraksinasi dengan 5 x 30 mL kloroform. Ambil lapisan kloroform, kemudian gabungkan dan keringkan dengan menggunakan NaSO₄ anhidrat. Pada penetapan kadar kafein, larutan standar kafein dan sampel ditotolkan pada lempeng KLT yang sama yaitu berukuran 10 x 20 cm menggunakan alat penotol Camag nanomat 4. Larutan induk kafein standar (1000 ppm) ditotolkan dengan volume 2, 4, 6, 8, 10 µL secara berturut – turut sedangkan volume penotolan sampel adalah 5 µL. Untuk penentuan *recovery* dilakukan penotolan pada lempeng yang sama yaitu 20 µl standar + 5 µL sampel. Perlakukan diulangi sebanyak tiga kali.

Lempeng KLT dielusi dengan fase gerak kloroform dan metanol (19:1) dengan jarak migrasi 90 mm (Verawati dkk, 2014).

Pada penelitian dengan jurnal isolasi kafein dengan metode sublimasi dari fraksi etil asetat dari serbuk daun teh hitam (*Camellia sinensis*) dengan bertujuan untuk mengetahui hasil dari identifikasi dan profil kromatografi senyawa kafein yang diisolasi dari fraksi etil asetat serbuk daun teh hitam (*Camellia sinensis*) dengan metode sublimasi. Menggunakan ekstraksi dengan teknik digesti dengan 600 gram serbuk daun teh hitam dalam 1000 mL air bersuhu 90⁰ C selama 30 menit. Campuran ekstrak kemudian disaring untuk memisahkan residu padatan serbuk daun teh hitam, kemudian diuapkan hingga volume air kurang dari 200 mL. Penetapan kadar kafein dilakukan dengan isolat kristal kafein sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 1 mL campuran kloroform : metanol (1:1). Lempeng Al Silica Gel GF254 dipotong dengan ukuran 2 x 10 cm. lempeng dielusi dengan fase gerak pada *chamber* yang telah jenuh. Diamati spektrum dalam densitometer dengan panjang gelombang 274 nm (Wilantari, dkk, 2018).

Berdasarkan dari (Riswanto dkk, 2015) kondisi analisis dari KLT-Densitometri menggunakan fase gerak yang terdiri dari metanol, etil asetat, dan ammonia 25%. Penentuan panjang gelombang pada 200-400 nm menggunakan instrumen densitometer. Panjang gelombang maksimal yang diperoleh dari nilai serapan paling optimal (tinggi) digunakan untuk menganalisis kafein dengan menggunakan metode KLT-Densitometri. Identifikasi secara kualitatif akan dilakukan menggunakan KLT-Densitometri

dengan membandingkan nilai R_f dan warna kromatogram antara standar dan sampel. Sementara identifikasi secara kuantitatif dilakukan menggunakan KLT-Densitometri, dengan mengukur luas area kromatogram sampel secara KLT-Densitometri dari kurva baku standar kafein.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana optimasi kondisi analisis penetapan kadar kafein pada ekstrak metanol teh hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur menggunakan KLT-Densitometri ?
2. Berapakah kadar kafein ekstrak metanol teh hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur menggunakan KLT-Densitometri?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui optimasi kondisi analisis penetapan kadar kafein dari PTPN XII Lawang Jawa Timur pada teh hitam menggunakan metode KLT-Densitometri

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui optimasi kondisi analisis penetapan kadar kafein dari PTPN XII Lawang Jawa Timur ekstrak metanol teh hitam menggunakan KLT-Densitometri
2. Untuk mengetahui kadar kafein ekstrak metanol teh hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur menggunakan KLT-Densitometri

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukannya penelitian ini adalah:

1.4.1 Secara Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi ilmu pengetahuan mengenai optimasi kondisi analisis penetapan kadar kafein dengan ekstrak metanol teh hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur menggunakan KLT-Densitometri

1.4.2 Secara Praktis

Penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai informasi bagi industri farmasi dan masyarakat mengenai optimasi kondisi analisis penetapan kadar kafein dengan ekstrak metanol teh hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur menggunakan KLT-Densitometri

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian penelitian

Penelitian	Persamaan	Perbedaan
Verawati, dkk., 2014	KLT-Densitometri	<ul style="list-style-type: none"> a. Penetapan kadar kafein teh hitam b. Ekstraksi dengan maserasi
Wilantari, dkk, 2018	KLT-Densitometri	<ul style="list-style-type: none"> a. Penetapan kadar kafein teh hitam b. Menggunakan pelarut metanol

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Teh

2.1.1 Tanaman Teh

Teh mempunyai karakteristik mutu dan aktivitas biologis yang potensial. Semua jenis teh dihasilkan dari bahan baku yang sama yaitu tanaman teh. Tanaman teh yang dibudidayakan secara komersial terdiri dari dua varietas utama, yaitu *Camellia sinensis (L) O. Kuntze var. sinensis* dan *Camellia sinensis (Master) Kitamura var. Assamica*. (Rohdiana, 2015). Berikut klasifikasi tanaman teh :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Sub kelas	: Dialypetalae
Ordo	: Guttiferales
Familia	: Camelliaceae
Genus	: <i>Camellia</i>
Spesies	: <i>Camellia Sinensis</i>



Gambar 2.1 Tanaman teh (Wikipedia, 2017)

Teh (*Camellia Sinensis*) yaitu suatu tanaman yang memiliki khasiat obat herbal. Tanaman teh memiliki ciri-ciri batangnya tegak, berkayu, bercabang-

cabang, ujung ranting dan daun mudanya berambut halus. Tanaman teh memiliki daun tunggal, bertangkai pendek, letaknya berseling, helai daunnya kaku seperti kulit tipis, panjangnya 6-18 cm, lebarnya 2-6 cm, warnanya hijau, dan permukaan mengkilap. Teh yang baik dihasilkan dari bagian pucuk (peko) ditambah 2-3 helai daun muda, karena pada daun muda tersebut kaya akan senyawa polifenol, kafein serta asam amino. Senyawa-senyawa inilah yang mempengaruhi kualitas, warna, aroma, dan rasa dari teh. Kandungan senyawa kimia dalam daun teh terdiri dari tiga kelompok besar yang masing-masing mempunyai manfaat bagi kesehatan, yakni polifenol, kafein dan *essential oil*. Zat-zat yang terdapat dalam teh sangat mudah teroksidasi. Bila daun teh terkena sinar matahari, maka proses oksidasi telah terjadi. Adapun jenis teh yang umumnya dikenal oleh masyarakat adalah teh hijau, teh oolong, teh putih, dan teh hitam (Ajisaka, 2012).

Sejak abad ke-4 M teh terkenal di China dan dimanfaatkan sebagai ramuan obat. Tanaman Teh (*Camellia Sinensis*) berasal dari Asia Tenggara. Teh merupakan tanaman yang dapat tumbuh di dataran rendah maupun dataran tinggi. Namun di Indonesia umumnya tanaman teh ditanam di daerah dataran tinggi yang beriklim sejuk. Semakin tinggi daerah penanaman teh maka semakin tinggi mutu daun teh yang dihasilkan (Ghani, 2002). Pada tahun 1684, Andreas Cleyer membawa biji teh dari Jepang ke Indonesia dan ditanam di Jakarta kemudian pada tahun 1824 Sierbold mempromosikan usaha pembudidayaan dengan bibit teh dari Jepang. Selanjutnya, teh berhasil ditanam di Kebun Raya Bogor pada tahun 1826. Usaha perkebunan teh pertama di Indonesia dipelopori oleh ahli teh Jacobus Lodewijk pada tahun 1828. Sejak saat itu teh merupakan komoditas yang

menguntungkan sehingga pada masa pemerintahan Van den Bosch, teh menjadi salah satu tanaman yang harus ditanam rakyat melalui politik tanam paksa. Setelah Indonesia merdeka, usaha perkebunan dan perdagangan teh diambil kembali (Somantri, 2011).

Salah satu komponen yang menentukan kualitas teh adalah kafein (Khokhar & Magnusdottir, 2002; Saravanan, John, Kumar, Pius, & Sasikumar, 2005; Owuor et al., 2006, Bao et al., 2008; Tang, Li, & Tang, 2011). Peran penting kafein adalah dapat menentukan cita rasa teh terutama rasa pahit atau sepet (Pusat Penelitian Teh dan Kina [PPTK], 2006). Kandungan kafein yang tinggi pada daun teh kurang diinginkan karena sifat farmakologinya dapat merangsang sistem saraf sentral (Takeda, 1994 *cited in* Mitrowihardjo, 2012).

2.1.2 Jenis Teh Berdasarkan Proses Pengolahan

Berdasarkan proses pengolahannya, jenis teh dapat dibedakan menjadi teh tanpa fermentasi (teh putih dan teh hijau), teh semi fermentasi (teh oolong), dan teh fermentasi (teh hitam).

a. Teh tanpa fermentasi

1) Teh putih

Teh putih merupakan jenis teh yang tidak mengalami proses fermentasi sama sekali, dimana proses pengeringan dan penguapan dilakukan dengan sangat singkat. Teh putih diambil hanya dari daun teh pilihan yang dipetik dan dipanen sebelum benar-benar mekar. Teh putih terkenal sebagai dewi-dewinya teh karena diambil dari kuncup daun terbaik dari setiap pohonnya, dan disebut teh putih karena ketika dipetik kuncup daunnya masih ditutupi seperti rambut putih yang

halus. Daun teh yang dipetik adalah pucuk daun yang muda, kemudian dikeringkan dengan metode penguapan (*steam dried*) atau dibiarkan kering oleh udara (*air dried*) (Balitri, 2012).

2) Teh hijau

Teh hijau merupakan teh yang tidak mengalami proses fermentasi dan banyak dikonsumsi orang karena nilai medisnya. Teh hijau kerap digunakan untuk membantu proses pencernaan dan juga karena kemampuannya dalam membunuh bakteri. Kandungan polifenol yang tinggi dalam teh hijau dimanfaatkan untuk membunuh bakteri-bakteri perusak dan juga bakteri yang menyebabkan penyakit di rongga mulut (Watanabe et al, 2009). Secara umum, teh hijau dibedakan menjadi teh hijau China (*Panning type*) dan teh hijau Jepang (*Steaming type*). Baik teh hijau China maupun Jepang, prinsip dasar pengolahannya adalah inaktivasi enzim polifenol oksidase untuk mencegah terjadinya oksimatis yang merubah polifenol menjadi senyawa oksidasinya berupa *theaflavin* dan *thearubigin*. Pada proses pengolahan teh hijau China digunakan mesin pelayuan berupa *rotary panner* untuk menginaktivasi enzim. Sementara itu, proses teh hijau Jepang menggunakan *steamer* untuk menginaktivasi enzimnya. Daun teh yang sudah dilayukan, kemudian digulung dan dikeringkan sampai kadar air tertentu (Rohdiana, 2015).

b. Teh semi fermentasi (Teh oolong)

Teh oolong merupakan teh yang dalam pembuatannya mengalami oksidasi sebagian. Untuk menghasilkan teh oolong, daun teh dilayukan dengan cara dijemur atau di angin-angin, kemudian diayak agar daun teh mengalami oksidasi

sesuai dengan tingkatan yang diinginkan. Teh yang telah selesai dioksidasi lantas dikeringkan, kemudian diproses hingga membentuk yang khas, yaitu seperti daun terpilin. Proses terakhir adalah pengeringan kembali. Teh oolong memiliki kandungan antioksidan yang lebih tinggi daripada teh hitam namun lebih rendah dari teh hijau karena teh oolong telah mengalami oksidasi sebagian. Keunggulan teh oolong daripada teh hijau adalah adalah cita rasa dan aroma yang dimilikinya lebih disukai daripada teh hijau yang cenderung memiliki cita rasa yang pahit (Gardjito, 2011).

c. Teh fermentasi (Teh hitam)

Teh hitam atau teh fermentasi adalah teh yang mengalami proses oksidasi enzimatis. Teh ini didapat dari hasil penggilingan yang menyebabkan daun terluka dan mengeluarkan getah. Getah itu bersentuhan dengan udara sehingga menghasilkan senyawa *theaflavin* dan *thearubigin*. Warna hijau bakal berubah menjadi kecoklatan dan selama proses pengeringan menjadi hitam. Teh hitam paling dikenal luas dan banyak dikonsumsi (Sujayanto, 2008).

2.2 Teh Hitam

Proses pembuatan teh hitam meliputi beberapa tahap, yaitu pelayuan, penggilingan, fermentasi, pengeringan, dan sortasi. Pelayuan dilakukan dengan menghamparkan daun teh dan diberikan udara panas selama 12-18 jam dengan tujuan untuk menurunkan kadar airnya hingga 5%-56% dan daun menjadi lembut sehingga mudah digiling. Tahap penggilingan menyebabkan kerusakan pada sel daun sehingga proses oksidasi dapat berlangsung. Fermentasi adalah reaksi oksidasi enzimatik dari cairan sel daun teh dengan oksigen yang menyebabkan

warna daun teh menjadi lebih gelap. Sedangkan pengeringan dilakukan dengan memberikan udara panas selama kurang lebih 20 menit untuk menghentikan reaksi oksidasi dan mengurangi kadar airnya. Pada tahap sortasi, banyak daun teh yang robek atau remuk sehingga produk teh akhir terdiri atas daun utuh, daun robek, dan partikel-partikel yang lebih kecil. Bubuk teh akan dipilih atau disortasi sesuai dengan mutu yang telah ditentukan (Soraya, 2007).

Teh hitam diolah dari daun *Camellia sinensis* dengan proses fermentasi. Berbeda dengan teh hijau, pada pengolahan teh hitam tidak dilakukan proses inaktivasi enzim PPO (*Polyphenol Oxidase*). Aktivasi enzim tersebut digunakan dalam pembentukan pigmen (*theaflavin* dan *thearubugin*). Hasil epimerisasi pada proses fermentasi akan mengalami oksidasi oleh katekol oksidase dan menghasilkan *o-quinone* yang kemudian akan membentuk kompleks yang disebut *theflavin*. Setelah proses fermentasi selesai, daun teh tersebut dikeringkan untuk menginaktivasi enzim dan menghentikan proses fermentasi. Pada proses ini, warna daun teh berubah menjadi coklat kehitaman, terjadi perubahan aroma dan kelembaban turun hingga kurang dari 6% (Shahidi dan Naczk, 2004).

Teh yang berwarna coklat kehitaman yang dihasilkan melalui proses fermentasi. Perubahan biokimiawi bisa disebut sempurna bila terbentuk senyawa turunan yang dikenal sebagai theaflavin dan thearubigin. Ini terjadi pada proses pembuatan teh hitam (*Black Tea*). Dalam teh hitam hampir semua tanin mengalami reaksi kondensasi menjadi dua senyawa turunan tadi. Itu sebabnya mengapa teh hitam juga disebut sebagai teh terfermentasi sempurna (*fully fermented tea*) (Ardheniati, 2008).

Teh merupakan sumber yang kaya polyphenol, khususnya flavonoid. Flavonoid utama yang terdapat dalam teh hitam termasuk katekin (*flavan-2-OLS*) adalah *Epicatechin* (EC), *Epicatechin-3-gallate* (ECG), *Epigallocatechin* (EGC) dan *Epigallocatechin-3-gallate* (ECG) (Astuti, 2001). Teh hitam seduh mengandung katekin sekitar 3-10%. Katekin teh memiliki sifat tidak berwarna, larut air, dan membawa sifat pahit atau sepat pada seduhan teh. Hampir semua sifat produk teh baik rasa, warna, dan aroma dihubungkan dengan modifikasi pada katekin. Misalnya degallosasi dari katekin ester menjadi katekin non-ester dapat menurunkan rasa pahit dan sepat dari teh. Katekin tahan terhadap kondisi lambung dan baru terdegradasi pada suasana basa (Hariana, 2003).

Tabel 2.1 Komposisi senyawa dalam teh hitam

No	Komponen	Berat kandungan %
1	Kafein	7,56
2	EpiKatekin	1,21
3	EpiKatekin galat	3,86
4	Epigalokatekin	1,09
5	Epigalokatekin galat	4,63
6	Theaflavin	2,62
7	Thearubigin	35,90
8	Asam gallat	1,15
9	Asam klorogenat	0,21
10	Gula	6,85
11	Pektin	0,16
12	Polisakarida	4,17

13	Asam oksalat	1,50
14	Asam malonat	0,02
15	Asam suksinat	0,09
16	Asam malat	0,31
17	Asam akonitat	0,01
18	Asam sitrat	0,84
19	Peptida	5,99
20	Theanin	3,57
21	Asam amino lain	3,03

(Graham *di dalam* Liss, 1984).

2.3 Kafein

a) Pengertian kafein dan struktur kimia kafein

Kafein merupakan senyawa alkaloida turunan xanthine (basa purin) yang berwujud kristal berwarna putih. Kafein bersifat psikoaktif, digunakan sebagai stimulant sistem saraf pusat dan mempercepat metabolisme (diuretik). Konsumsi kafein berguna untuk meningkatkan kewaspadaan, menghilangkan kantuk dan menaikkan mood (Smith, Maben, & Brockman, 1993). Kafein merupakan jenis substansi psikoaktif yang paling banyak dikonsumsi sepanjang sejarah (James, 1998). Menurut Snel dan Lorist, 2011 kafein merupakan suatu senyawa yang bersifat stimulant yang juga biasa terdapat pada beberapa jenis minuman, obat, suplemen dan permen.

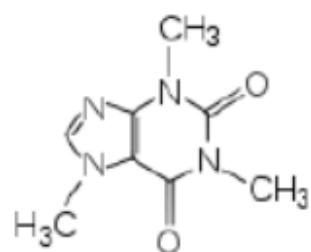
Kafein merupakan zat antagonis reseptor adenosine sentral yang dapat mempengaruhi fungsi sistem saraf pusat dan mengakibatkan gangguan tidur. Anak yang mengkonsumsi minuman berkafein sekurang-kurangnya sekali sehari,

memiliki jumlah tidur mingguan 3 jam 30 menit kurang berbanding anak yang tidak mengkonsumsi kafein (Krichheimer, 2004 dalam Nurdiani, 2012).

Kafein adalah alkaloid putih dengan rumus senyawa lain $C_8H_{10}N_4O_2$ dan rumus kimia 1,3,5-trimethylxanthine. Kafein juga mempunyai struktur kimia yang mirip dengan 3 senyawa alkaloid yaitu xanthine, theophylline, dan theobromin.

b) Sifat fisik kafein

Nama lain	: 1,3,5-trimethylxanthine, theine, methyltheobromine
Wujud	: bubuk putih tidak berbau
Berat molekul	: 194,19 g/mol
Densitas	: 1,23 g/cm ³ , solid
Titik leleh	: 227 – 228 °C (anhydrous)
	234 – 235 °C (monohydrate)
Titik didih	: 178 °C
Kelarutan dalam air	: 2,17 g/ 100 ml (25 °C)
	18,0 g/ 100 ml (80 °C)
	67,0 g/ 100 ml (100 °C)
Rumus molekul	: $C_8H_{10}N_4O_2$



Gambar 2.2 Struktur Kimia Kafein

(Mumin *et al.*, 2006)

c) Sumber kafein

Kafein banyak terdapat pada minuman, obat, suplemen dan permen adalah stimulant yang paling banyak digunakan didunia (Snel & Lorist, 2011 dalam Purdiani, 2014). Kafein adalah alkaloida yang terdapat dalam biji kopi, biji guarana, daun teh, buah cola. Zat ini terkandung dalam kopi, teh, minuman berenergi soda dan coklat. Kafein tersedia secara luas, banyak dipasarkan, dan dapat diterima secara sosial, bahkan dikalangan anak dan populasi remaja karena dipercaya dapat mempengaruhi performa atau kinerja dan keadaan mental dengan mengurangi atau menghilangkan tidur (James & Keane, 2007; James & Roger, 2005).

Teh adalah sumber kafein yang lain, dan mengandung setengah dari kafein yang dikandung kopi. Teh merupakan minuman yang sudah dikenal dengan luas di Indonesia dan di dunia. Teh digunakan sebagai antioksidan, memperbaiki sel-sel yang rusak, menghaluskan kulit, melangsingkan tubuh, mencegah kanker, mencegah penyakit jantung, mengurangi kolesterol dalam darah, melancarkan sirkulasi darah. Hal ini disebabkan karena teh mengandung senyawa-senyawa bermanfaat seperti polifenol, theofilin, flavonoid/metilxantin, tannin, vitamin C dan E, katekin, serta sejumlah mineral seperti Zn, Se, Mo, Ge, Mg (Chemistry.org). Beberapa tipe teh yaitu teh hitam mengandung lebih banyak kafein dibandingkan jenis teh yang lain.

2.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis oleh sistem yang terdiri dari 2 fase atau

lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan muatan ion. Dengan demikian masing-masing zat dapat diidentifikasi atau ditetapkan dengan metode analitik (Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan, 1995b).

KLT adalah suatu metode pemisahan fisikokimia dimana fase diam terdiri dari butir-butir pada penyangga pelat gelas logam atau lapisan yang cocok (Stahl, 1985). KLT banyak digunakan dilaboratorium untuk analisis maupun kontrol kualitas. Keuntungan sistem KLT adalah mudah dilakukan, tersedianya reagen yang sensitif dan selektif yang tidak dipengaruhi oleh fase gerak. Peralatan yang diperlukan sedikit, murah, sederhana, waktu analisis cepat, dan daya pisah cukup baik (Grtitter, dkk., 1991).

Teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut terdistribusi di antara dua fase, satu diantaranya diam (fase diam), yang lainnya bergerak (fase gerak). Fase gerak membawa zat terlarut melalui media, hingga terpisah dari zat terlarut lainnya, yang terelusi lebih awal atau lebih akhir. Umumnya zat terlarut dibawa melalui media pemisah oleh aliran pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen. Fase diam dapat bertindak sebagai adsorben, seperti halnya adsorben alumina yang diaktifkan, silika gel, dan resin penukar ion, atau dapat bertindak melarutkan zat terlarut sehingga partisi antara fase diam dan fase gerak. Dalam proses terakhir ini suatu lapisan cairan dalam suatu penyangga yang inert

berfungsi sebagai fase diam (Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan, 1995b).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) bersama-sama dengan kromatografi kertas dengan berbagai macam variasinya pada umumnya merupakan kromatografi planar. KLT dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1993. Pada KLT, fase diamnya berupa lapisan yang seragam (uniform) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium atau pelat plastik. Meskipun demikian, kromatografi planar ini dapat dikatakan sebagai bentuk terbuka dari kromatografi kolom (Rohman, 2009).

Kromatografi lapis tipis dalam pelaksanaannya lebih mudah dan lebih murah dibandingkan kromatografi kolom. Demikian juga peralatan yang digunakan. Dalam kromatografi lapis tipis, peralatan yang digunakan lebih sederhana dan dapat dikatakan bahwa hampir semua laboratorium dapat melaksanakan setiap saat secara cepat (Rohman, 2009).

Pemilihan pelarut yang digunakan untuk senyawa yang akan dianalisis dengan metode KLT, harus dapat melarutkan analit dengan sempurna, mudah menguap, viskositas rendah, serta dapat membasahi lapisan penyerap (Sherma and Fried, 1996).

Deteksi bercak pemisahan pada KLT dapat dilakukan dengan cara-cara berikut :

- a. Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang-kadang bercak

dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan intensitas warna bercak.

- b. Mengamati lempeng di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 atau 366 nm untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi.
- c. Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam kecoklatan.
- d. Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam chamber tertutup.
- e. Melakukan scanning pada permukaan lempeng dengan densitometer (Grandjar dan Rohman, 2007)

Pada kromatografi planar, senyawa yang berbeda dalam campuran sampel menempuh jarak yang berbeda sesuai dengan seberapa kuat mereka berinteraksi dengan fase diam dibandingkan dengan fase gerak. Semakin polar solut maka semakin tertahan kuat ke dalam adsorben kuat (silika gel). Solut-solut non polar tidak mempunyai afinitas atau mempunyai sedikit afinitas terhadap adsorben polar, sementara solut-solut yang terpolarisasi memiliki afinitas yang kecil terhadap adsorben polar disebabkan adanya interaksi dipol atau interaksi-interaksi yang diinduksi oleh dipol. Solut-solut polar, terutama yang membentuk ikatan hidrogen, akan terikat kuat pada adsorben karenanya butuh fase gerak yang cukup polar untuk mengelusinya. Berikut adalah urutan polaritas solut-solut: alkana < alkena < aromatis < eter < ester < keton dan

aldehid < tiol < amin dan amida < alkohol < fenol < asam-asam organik (Gandjar dan Rohman, 2007).

Retardation factor (Rf) merupakan parameter karakteristik KLT. Harga Rf didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak senyawa dari titik awal dan jarak tepi muka pelarut dari titik awal (Roth, 1994). Angka Rf berjangka antara 0,00 sampai 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal (Stahl, 1985)

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

(Dean, 1995)

Harga Rf untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga standar. Pengukuran yang sering dipakai lainnya menggunakan pengertian Rx atau Rstd yang didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak yang digerakkan oleh senyawa yang tidak diketahui dengan jarak yang digerakkan oleh senyawa standar yang diketahui (Hardjono, 1983). Nilai Rx dapat dihitung:

$$Rx, a = \frac{\text{jarak yang dilalui oleh zat terlarut } a}{\text{jarak yang dilalui oleh senyawa standar } x}$$

(Dean, 1995)

Pengekoran nada kromatogram terjadi apabila proses pemisahan yang terjadi tidak sempurna. Terlalu tingginya konsentrasi komponen yang ditentukan juga merupakan salah satu penyebab terjadinya kromatogram yang berekor. Penyebab pengekoran yang lain adalah ketidakjenuhan chamber. Ketidaktepatan pemilihan fase gerak terhadap jenis fase diam dan macam sampel yang dianalisis

juga merupakan penyebab pengekoran kromatogram yang lainnya (Mulja dan Suharman, 1995).

2.4.1 Sistem Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Fase diam

Fase diam yang sering digunakan dalam KLT adalah bahan penjerap (adsorben). Silika gel merupakan penjerap yang paling banyak digunakan dalam KLT. Pada umumnya ditambah dengan bahan pengikat untuk memberikan kekuatan perlekatan pada pendukungnya. Bahan pengikat yang sering digunakan adalah gypsum, dan silika gel yang diberikan tambahan senyawa, ini dikenal dengan istilah “silika gel G”. kadang-kadang untuk mempermudah identifikasi ditambah zat yang berfluoresensi sehingga dikenal dengan istilah silika gel G. Bahan penjerap lain yang digunakan adalah alumina, selulosa, sefadex, poliamida, kieselguhr, dan amilum (Harborne, 1973).

Adanya air dari atmosfer yang diserap oleh permukaan silika gel mampu mendeaktifkan permukaan silika gel karena air akan menutup sisi aktif silika gel. Hal seperti ini dapat diatasi dengan memanaskan lempeng pada suhu 105°C (Gandjar dan Rohman, 2007).

b. Fase gerak

Fase gerak adalah medium angkut yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Fase gerak bergerak di dalam fase diam yaitu lapisan berpori karena ada daya kapiler. Yang digunakan adalah pelarut bertingkat mutu analitik dan bila diperlukan sistem pelarut multikomponen, maka harus berupa suatu campuran sederhana mungkin terdiri atas maksimum tiga komponen (Stahl, 1985).

Pemilihan sistem pelarut untuk mencapai sistem pemisahan yang diperlukan mungkin melibatkan beberapa percobaan, tetapi pilihan pelarut cukup terbatas dengan pertimbangan interferensi respon detektor atau kerusakan yang mungkin terjadi dari fase diam (Dean, 1995).

Berikut adalah beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak :

- 1) Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif.
- 2) Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f solut terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan (Rohman, 2009).

2.4.2 Densitometri

Densitometri merupakan metode analisis instrumental yang mendasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan bercak pada klat KLT. Densitometri lebih dititikberatkan untuk analisis kuantitatif analit-analit dengan kadar kecil, yang mana diperlukan pemisahan terlebih dahulu dengan KLT (Rohman, 2009).

KLT densitometri merupakan salah satu dari metode analisa kuantitatif. Penetapan kadar suatu senyawa dengan metode ini dilakukan dengan mengukur kerapatan bercak senyawa yang dipisahkan dengan cara KLT. Pada umumnya pengukuran kerapatan bercak tersebut dibandingkan dengan kerapatan bercak senyawa standar yang dielusi bersama-sama (Hardjono, 1985).

Metode densitometri mempunyai cara kerja yang sederhana dan cepat. Pada metode densitometri diperlukan adsorben dan fase gerak yang murni. Untuk memperoleh hasil yang baik umumnya digunakan adsorben siap pakai yang telah mengalami pra pencucian (Gritter, 1991).

Alat densitometri mempunyai sumber sinar yang bergerak diatas bercak pemisahan pada lempeng kromatografi yang akan ditetapkan kadar komponennya. Lempeng digerakkan menyusuri berkas sinar yang berasal dari sumber sinar tersebut. Bercak yang kecil dan intensif akan menghasilkan suatu puncak kurva absorpsi yang sempit dan tajam, sebaliknya bercak yang lebar akan menghasilkan puncak kurva absorpsi yang melebar dan tumpul (Sudjadi, 1988).

Densitometri merupakan metode analisis instrumental yang menggunakan interaksi radiasi gelombang radiasi elektromagnetik (REM) dengan analit yang merupakan noda pada lempeng KLT. Metode densitometri dapat digunakan untuk analisis kuantitatif dan kualitatif. Densitometri dapat bekerja secara serapan atau fluoresensi. Kebanyakan densitometer mempunyai sumber cahaya monokromator (rentang panjang gelombang 190 – 800 nm) untuk memilih gelombang yang cocok, sistem akan memfokuskan sinar pada lempeng, pengganda foton, dan rekorder (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pada sistem serapan dapat dilakukan dengan metode pemantulan atau tranmisi. Pada cara pemantulan, yang diukur adalah sinar yang dipantulkan. Sinar yang digunakan dapat berupa sinar tampak atau ultraviolet. Sementara itu cara tranmisi dilakukan dengan meninjari bercak pada satu sisi dan mengukur sinar yang diteruskan pada sisi lain (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pada densitometer ada 3 sumber radiasi tergantung dari panjang gelombang yang digunakan. Lampu tungsten digunakan untuk mengukur daerah sinar tampak (400-800 nm) dan untuk pengukuran daerah ultraviolet (190-400 nm) digunakan lampu deuterium. Zat yang berpendar sendiri (*self-fluorescence*) diukur fluoresensinya menggunakan lampu uap merkuri bertekanan tinggi yang memiliki panjang gelombang antara 254-578 nm (Hans-Deinstrop, 2007).

2.5 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 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 ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran yang sama (Mukhriani, 2014).

2.5.1 Tujuan ekstraksi

Ekstraksi bahan alam bertujuan untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam. Ekstraksi didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat kedalam cairan penyari. Perpindahan tersebut mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk kedalam pelarut (Dirjen POM, 1986).

2.5.2 Jenis ekstraksi

Secara umum metode ekstraksi dibagi menjadi dua macam yaitu ekstraksi bertingkat dan ekstraksi tunggal. Ekstraksi bertingkat adalah ekstraksi yang dilakukan dengan berbagai pelarut yang memiliki kepolaran berbeda dan bertingkat dari kurang polar ke yang lebih polar. Sehingga diharapkan dapat memisahkan komponen-komponen berdasarkan polaritasnya, selain itu komponen yang diekstraksi sekaligus terfraksinasi ke dalam golongan senyawa yang berlainan berdasarkan kepolarnya. Kelebihan menggunakan metode ekstraksi ini ialah dapat menghasilkan rendemen yang besar dengan senyawa yang berbeda tingkat kepolarnya. Adapun ekstraksi tunggal adalah melarutkan bahan yang akan diekstrak dengan satu jenis pelarut. Kelebihan dari metode ini yaitu lebih sederhana dan tidak memerlukan banyak waktu, tetapi rendemen yang dihasilkan hanya sedikit (Taroresh *et al.*, 2015).

2.5.3 Cara-cara ekstraksi

Proses ekstraksi dengan pelarut, dipengaruhi oleh sifat pelarut yang akan dipakai dan pemilihan pelarut ditentukan oleh kelarutan bahan volatil dan kemudahan pemisahan pelarut. Suatu senyawa akan mudah larut dalam pelarut yang mempunyai polaritas yang sama atau mirip. Selain jenis pelarut, lama ekstraksi juga akan mempengaruhi senyawa yang akan diambil dari ekstrak (Adiyasa *et al.*, 2015). Pembagian metode ekstraksi yang dapat digunakan dalam metode ekstraksi (Harbone., 1997; Dirjen POM., 1986). Berikut pembagian metodenya:

a. Penyulingan

Penyulingan dapat dipertimbangkan untuk menyari serbuk simplisia yang mengandung komponen kimia yang mempunyai titik didih yang tinggi pada tekanan udara normal, yang pada pemanasan biasanya terjadi kerusakan zat aktifnya. Untuk mencegah hal tersebut, maka penyari dilakukan dengan penyulingan.

b. Maserasi

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai baik untuk skala kecil dan skala besar industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan 10 bagian serbuk tanaman dan 75 bagian pelarut yang sesuai dengan ekstrak kedalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya matahari. Penyarian dihentikan setelah pelarut tidak berwarna lagi, lalu dipindahkan kedalam bejana tertutup, dibiarkan pada tempat yang tidak berbahaya, setelah dua hari lalu endapan dipisahkan. Kerugian utama dalam metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun disisi lain metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil.

c. Perkolasi

Pada metode perkolasii serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok, menggunakan 2,5 bagian sampai bagian cairan penyari dimasukkan dalam bejana tertutup sekurang-kurangnya 3 jam. Massa dipindahkan sedikit demi sedikit kedalam perkulator, ditambahkan cairan penyari. Perkolator ditutup dibiarkan selama 24 jam, kemudian kran dibuka dengan kecepatan 1 ml permenit, sehingga simplisia tetap terendam. Filtrate dipindahkan kedalam bejana ditutup dan dibiarkan selama 2 hari pada tempat terlindung cahaya. Kelebihan dari metode ini adalah sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya adalah jika sampel dalam perkulator tidak homogeny maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu.

d. Soxhlet

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya ekstraksi secara berkesinambungan. Cairan penyari dipanaskan sampai mendidih uap penyari akan naik melalui pipa samping, kemudian diembunkan lagi oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia selanjutnya bila cairan penyari mencapai sifon, maka seluruh cairan akan turun ke labu alas bulat dan terjadi proses sirkulasi. Demikian seterusnya sampai zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersari seluruhnya yang ditandai jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifon.

Keuntungan dari metode ini adalah proses ekstraksi yang kontinyu, sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugiannya adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih.

e. Reflux dan Destilasi uap

Pada metode reflux, sampel dimasukkan bersama pelarut kedalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan sehingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali kedalam labu.

Destilasi uap memiliki proses yang sama dan biasanya digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial (campuran berbagai senyawa menguap). Selama pemanasan uap terkondensasi dan destilat (terpisah sebagai dua bagian yang tidak saling bercampur) ditampung dalam wadah yang terhubung dengan kondensor. Kerugian dari metode ini adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi (Mukhriani, 2014).

2.6 Tinjauan pelarut metanol

Pelarut organik berdasarkan konstanta elektrikum dapat dibedakan menjadi dua yaitu pelarut polar dan pelarut non polar. Konstanta dielektrikum dinyatakan sebagai gaya tolak menolak antara dua partikel yang bermuatan listrik dalam suatu molekul. Semakin tinggi konstanta dielektrikumnya maka pelarut bersifat semakin polar (Sudarmadji *et al*, 1989). Konstanta dielektrikum dari beberapa pelarut yang dapat dilihat pada Tabel 2.2

Tabel 2.2 Konstanta dielektrikum pelarut organik

Pelarut	Besarnya konstanta
n-heksan	2,0
Etil asetat	6,0
Kloroform	4,8
Asam asetat	6,2
Benzen	2,3
Etanol	24,3
Metanol	33,1
Air	80,4

Sumber : Sudarmadji *et al.* (1989)

Ekstraksi dapat menggunakan pelarut tunggal dan pelarut campuran.

Pelarut campuran yang biasa digunakan yaitu campuran air dan etanol, campuran air dan metanol, campuran air dan eter (Agoes, 2007). Menurut Guenther (1987), syarat pelarut yang digunakan pertama harus bersifat selektif artinya pelarut harus dapat melarutkan semua senyawa dengan cepat. Syarat kedua harus mempunyai titik didih yang cukup rendah. Hal ini supaya pelarut mudah dapat diuapkan tanpa menggunakan suhu tinggi, namun titik didih pelarut tidak boleh terlalu rendah karena akan mengakibatkan kehilangan akibat penguapan. Syarat ketiga bersifat inert artinya pelarut tidak bereaksi dengan komponen minyak. Syarat keempat carilah pelarut yang murah dan mudah didapatkan.

Pelarut yang dipilih pada penelitian ini adalah metanol. Metanol sering disebut metil alkohol, mempunyai rumus kimia CH_3OH dan merupakan pelarut yang tak berwarna. Menurut sejarahnya, metanol disebut alkohol kayu (Fessenden dan Fessenden, 1997). Pada Tabel 2.3 konstanta dielektrik metanol menunjukkan nilai yang paling tinggi sehingga dapat dipilih sebagai pelarut untuk mengekstrak

ampas seduhan teh hitam. Hasil penelitian Akroum *et al*, (2009) tentang aktivitas antimikrobia beberapa ekstrak tanaman, menunjukkan bahwa pelarut metanol merupakan pengekstrak yang baik untuk mengekstrak senyawa antimikrobia pada tumbuhan teh hitam.

2.7 Uji Fitokimia

Kimia tumbuhan atau fitokimia adalah cabang kimia organik yang berada diantara kimia organik bahan alam dan biokimia tumbuhan, serta berkaitan erat dengan keduanya. Bidang pertanian dari fitokimia adalah keanekaragaman senyawa organik yang dibentuk dan ditimbun oleh tumbuhan, yaitu mengenai struktur kimia, biosintesis, perubahan serta metabolismenya, penyebaran secara ilmiah, dan fungsi biologis (Rafi, 2003).

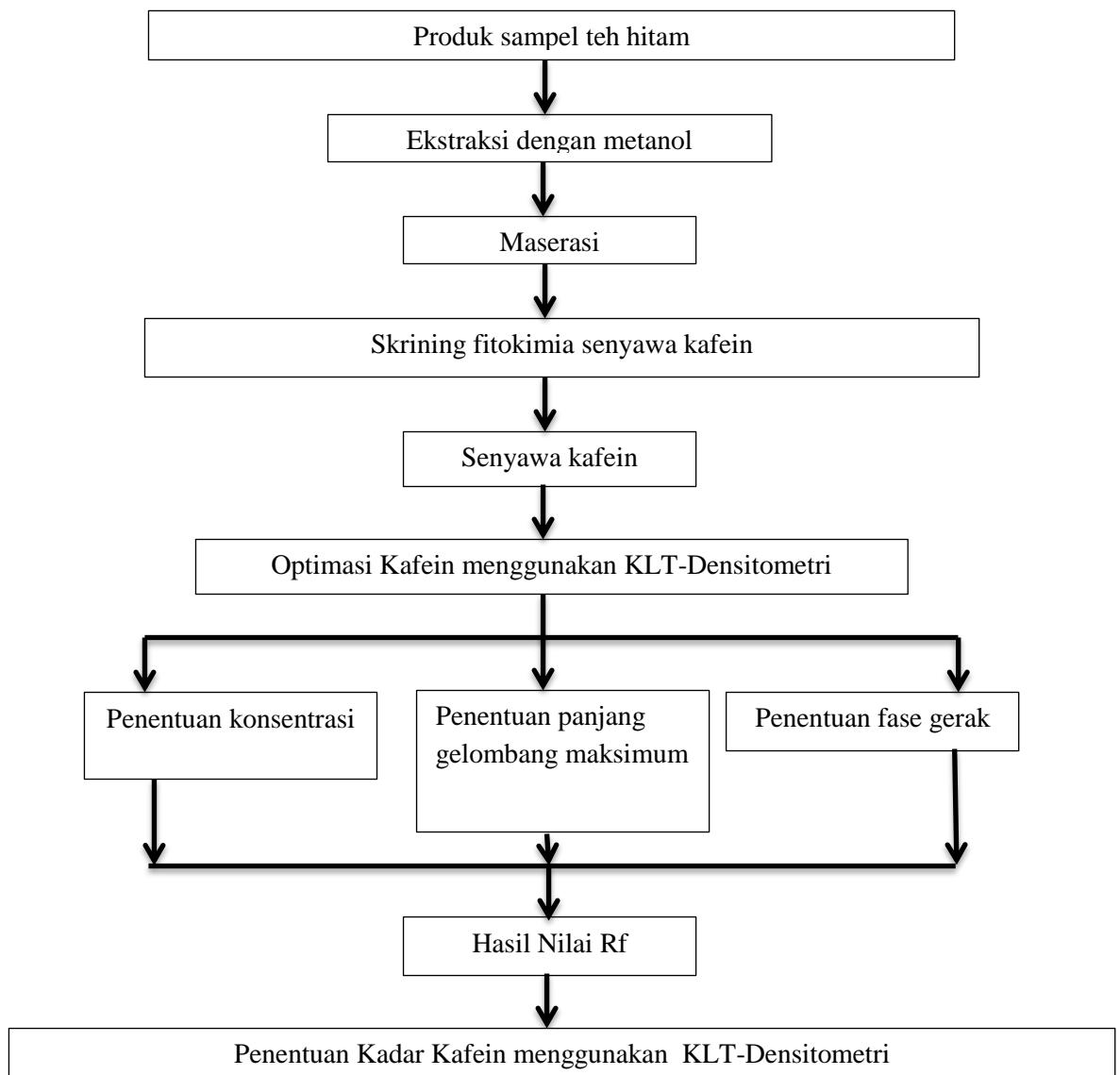
Analisis fitokimia atau uji fitokimia merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui keberadaan senyawa kimia spesifik seperti alkaloid, senyawa fenol (termasuk flavonoid), steroid, saponin, dan terpenoid tanpa menghasilkan penapisan biologis. Uji ini sangat bermanfaat untuk memberikan informasi jenis senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan. Senyawa-senyawa ini merupakan metabolit sekunder yang mungkin dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat. Analisis ini merupakan tahapan awal dalam isolasi senyawa bahan alam sehingga menjadi panduan bersama-sama dengan uji aktivitas biologis senyawa tersebut. Salah satu tujuan pengelompokan senyawa-senyawa aktif ini adalah untuk mengetahui hubungan biosintesis dan famili tumbuhan. Informasi ini sangat berguna bagi ahli sintesis kimia organik untuk memprediksi atau mengubah substituen senyawa aktif tersebut sehingga dapat lebih berkhasiat. Tanaman yang

diuji fitokimianya adalah dapat berupa tanaman segar, kering yang berupa rajangan, serbuk, ekstrak atau dalam bentuk sediaan (Rafi, 2003).

Uji fitokimia dilakukan berdasarkan pada reaksi yang menghasilkan warna atau endapan. Selama bertahun-tahun uji warna sederhana dan reaksi tetes dikembangkan untuk menunjukkan adanya senyawa tertentu atau golongan tertentu karena sudah terbukti khas dan peka. Uji fitokimia masih sering digunakan dalam pencirian senyawa karena mudah dan tidak memerlukan peralatan yang rumit akan tetapi kadang kala tidak dapat memberikan hasil yang memuaskan (Rafi, 2003).

BAB 3. KERANGKA KONSEP

3.1. Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka konsep

BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian adalah kerangka kerja yang digunakan untuk melaksanakan riset pemasaran (Malhotra, 2007). Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *True Experimental Laboratories* yang merupakan penelitian yang dilakukan di laboratorium.

4.2 Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas objek atau subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2011:80).

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk teh hitam dari PTPN XII Lawang Malang, Jawa Timur.

4.3 Sampel

Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut (Sugiyono, 2011:80).

Sampel yang digunakan yaitu ekstrak metanol teh hitam dari PTPN XII Lawang Malang, Jawa Timur.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas dr. Soebandi untuk melaksanakan proses ekstraksi atau pengolahan sampel dari teh hitam dan dilanjutkan menggunakan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas dr. Soebandi mulai bulan Maret 2021 - Juni 2021.

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah suatu atribut atau sifat atau nilai dari obyek atau kegiatan yang memiliki variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2015:38).

Tabel 4.1 Definisi operasional

Variabel	Pengertian	Cara ukur	Alat ukur	Skala
Optimasi kondisi analisis menggunakan KLT-Densitometri	1) Penentuan panjang gelombang 2) Penentuan konsentrasi 3) Penentuan fase gerak	4) Penentuan panjang gelombang 200-400 nm menggunakan KLT-Densitometri 5) Penentuan konsentrasi 400, 600, 800, 1000, 1200, dan 1200 ppm 6) Penentuan fase gerak menggunakan kloroform : etanol (99:1) v/v	KLT-Densitometri	Ratio
Penetapan kadar kafein	Salah satu metode pemisahan yang lebih simple dan mampu menghasilkan pemisahan yang akurat untuk senyawa-senyawa yang	Larutan standar kafein dan sampel ditotolkan pada lempeng KLT yang sama yaitu berukuran 10 x 20 cm menggunakan alat	KLT-Densitometri	Ratio

	<p>tidak volatil dengan konsentrasi sangat kecil</p>	<p>penol Camag nanomat 4. Larutan sampel ditotolkan 20 μl pada lempeng KLT yang telah diaktivasi dan dilakukan replikasi totolan sebanyak 6 kali <i>autosampler</i>. Kemudian lempeng KLT tersebut dielusi pada <i>chamber</i> yang telah dijenuhkan hingga jarak 7,5 cm. Lempeng diangin-anginkan kemudian dideteksi dengan densitometer pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh.</p>		
--	--	--	--	--

4.6 Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada optimasi kondisi analisis KLT Densitometri serta penetapan kadar kafein ekstrak metanol teh hitam didapatkan dengan cara :

4.6.1 Optimasi kafein menggunakan KLT-Densitometri

a. Penentuan fase gerak

Fase gerak yang digunakan untuk optimasi fase gerak yang didasarkan pada penelitian sebelumnya :

- 1) Fase gerak kloroform : metanol (19:1) v/v menurut (Verawati *et al*, 2014)
- 2) Fase gerak kloroform : etanol (99:1) v/v menurut (Fatoni, 2015)
- 3) Fase gerak etil asetat : metanol : air (100: 13,5: 10) v/v menurut (Mohammed and Al-Bayati,2009)

b. Penentuan panjang gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan *scanning* noda analit pada *Camag TLC Scanner* (Densitometri) dan *software* program visionCATS. Penilaian panjang gelombang maksimal dilakukan pada area panjang gelombang antara 200 – 400 nm. Penilaian panjang gelombang optimum dipilih berdasarkan panjang gelombang yang memiliki insensitas spektrum yang paling tinggi (Pertiwi, 2015).

c. Penentuan konsentrasi

Optimasi konsentrasi uji dilakukan pemilihan konsentrasi uji 400; 600; 800; 1000; 1200; dan 1400 ppm. Pemilihan ini didasarkan pada hasil optimasi yang menunjukkan perkiraan kandungan kafein pada teh hitam. Dengan demikian untuk mempermudah preparasi sampel, konsentrasi uji yang digunakan untuk optimasi adalah tingkat konsentrasi yang terbilang tinggi.

4.6.2 Penetapan kadar kafein menggunakan KLT-Densitometri

a. Ekstraksi maserasi

Produk teh hitam dihaluskan dengan cara di blender agar menjadi halus, kemudian diambil sebanyak 5 gram teh hitam yang sudah dihaluskan masing-masing ditempatkan dalam beaker glass 500 mL kemudian ditambahkan 250 mL metanol dan ditutup dengan aluminium foil. Selanjutnya campuran tersebut didiamkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, larutan disaring dengan kertas saring Whatman PTFE 0,45 µm. Ekstraksi maserasi dilakukan secara triplo.

b. Skrinning menggunakan reagen parry

Larutan standar kafein dan masing-masing ekstrak sampel daun teh hitam diletakkan di cawan porselin lalu ditambahkan 1 – 3 tetes reagen parry. Larutan berubah warna menjadi biru tua / hijau menyatakan terdapat kafein (Depkes, 1995).

c. Aktivasi lempeng KLT silika gel F₂₅₄

Lempeng silika gel 60 F₂₅₄ dengan ukuran 20x20 cm disiapkan, kemudian dipotong dengan ukuran 10x20cm. Lempeng KLT diaktivasi dengan pemanasan di oven pada suhu 120°C selama kurang lebih 45 menit (Staenly, 2018).

d. Penjenuhan chamber

Fase gerak yang akan digunakan kloroform: etanol (99 : 1) dituang kedalam dasar bejana/chamber, dicelupkan kertas saring pada fase gerak. Bejana ditutup, lalu fase gerak dibiarkan menguap hingga

membasahi kertas saring selama kurang lebih 1 jam atau bila fase gerak telah mencapai tujuh perdelapan tinggi kertas saring (FI V, 2014).

e. Pembuatan larutan baku kafein

Baku kafein ditimbang seksama kurang lebih 200 mg. Kafein dilarutkan dengan kloroform (*proanalysis grade*) hingga batas tanda di dalam labu takar 100 mL sehingga didapat konsentrasi larutan stok kafein 2000 ppm.

f. Pembuatan larutan standar kafein

Larutan seri kafein dibuat dengan mengambil masing-masing 400, 600, 800, 1000, 1200, dan 1400 ppm.

g. Pembuatan larutan sampel

Sebanyak 1 gram ekstrak metanol teh hitam, ditambah 5 mL asam sulfat 1N, dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit. Disaring dalam keadaan panas, didinginkan, kemudian dialkaliskan dengan 5 mL ammonia 6N dalam corong pisah dan diekstraksi dengan 5 mL klorofom. Larutan kloroform dipisahkan dan sisa-sisa air dihilangkan dengan sedikit Na sulfat anhidrat, selanjutnya sari kloroform dipekatkan sampai 0,1 mL. Residu ditambah 1 mL kloroform-metanol (6:4) (Wibowo, 2010).

h. Penentuan kurva baku

Larutan seri kafein konsentrasi 400, 600, 800, 1000, 1200, dan 1400 ppm ditotol menggunakan instrumen autosampler linomat

sebanyak 20 μl pada lempeng KLT yang telah diaktivasi pada suhu 120^0C selama ± 45 menit. Tiap totolan diberi jarak 1 cm, jarak dari samping kanan-kiri 1 cm, dan jarak dari bawah 2 cm. Lempeng KLT tersebut dielusi hingga jarak 75 mm pada chamber yang telah dijenuhkan dengan fase gerak (kloroform : etanol). Lempeng dikeringkan kemudian dibaca serapan menggunakan densitometer dengan panjang gelombang maksimal yang telah didapatkan sebelumnya. Dibuat persamaan garis $y = bx + a$ hubungan antara konsentrasi dengan respon (AUC) (Staenly, 2018).

i. Penentuan nilai Rf

Retardation factor (Rf) merupakan parameter karakteristik KLT. Harga Rf didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak senyawa dari titik awal dan jarak tepi muka pelarut dari titik awal (Roth, 1994). Angka Rf berjangka antara 0,00 sampai 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal (Stahl, 1985).

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

(Dean, 1995)

BAB 5. HASIL PENELITIAN

5.1 Data umum

1. Ekstraksi maserasi

Pada ekstraksi maserasi ini telah didapatkan hasil nilai ekstraksi maserasi yang dapat dilihat pada Tabel 5.1

Tabel 5.1 Hasil ekstraksi maserasi metanol teh hitam

Hasil ekstrak kering	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
Berat serbuk awal (g)	5,0895	5,0670	5,0278
Berat cawan kosong (g)	63,8024	58,1205	70,0750
Berat cawan + ekstrak kering (g)	65,0871	59,4523	71,7051
Berat ekstrak kering (g)	1,2847	1,3318	1,6301
% Rendemen	25,24	26,28	32,42
(Rata –rata ekstrak kering (g) = (Rata-rata % rendemen)	(1,4156 = 27,98%)		

2. Skrinning kimia

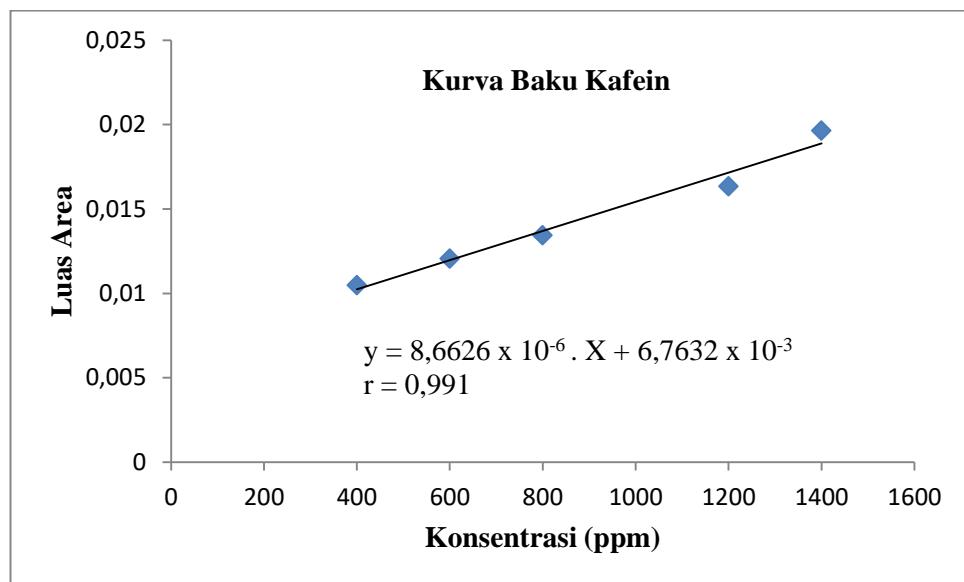
Pada skrinning kimia dihasilkan warna hijau menandakan adanya senyawa kafein pada teh hitam. Hasil dari skrinning kimia menggunakan reagen parry dapat dilihat pada Gambar 5.1



Gambar 5.1 Skrinning kimia sampel

3. Penentuan kurva baku

Pada penelitian ini digunakan 5 seri standar dengan konsentrasi yang berbeda-beda, yaitu 400 ppm; 600 ppm; 800 ppm; 1200 ppm; 1400 ppm. Berdasarkan pengukuran tersebut, didapatkan hasil regresi linier yang dapat dilihat pada Gambar 5.2



Gambar 5.2 Kurva baku kafein

4. Penentuan nilai Rf

Lima seri standar serta tiga sampel tersebut dieluasi menggunakan fase gerak kloroform : etanol dan fase diam silika gel F₂₅₄, dan dilakukan pengukuran AUC 6 seri standar pada panjang gelombang 275 nm dengan *TLC densitometry scanner* sehingga didapatkan data kurva baku berupa AUC. Berdasarkan pengukuran tersebut, dapat dilihat pada Tabel 5.2

Tabel 5.2 Luas area dan nilai Rf standar dengan sampel

Vial ID	Luas area	Rf
Standar 1 (400 ppm)	0,01048	0,164
Standar 2 (600 ppm)	0,01205	0,150
Standar 3 (800 ppm)	0,01343	0,152
Standar 4 (1200 ppm)	0,01633	0,160
Standar 5 (1400 ppm)	0,01964	0,159
Sampel 1 (768 ppm)	0,01893	0,151
Sampel 2 (792 ppm)	0,01334	0,151
Sampel 3 (812 ppm)	0,01309	0,150

5.2 Data khusus

5.2.1 Optimasi kondisi analisis kafein ekstrak metanol teh hitam

a. Penentuan fase gerak

Pada penelitian ini menentukan fase gerak sebanyak 3 kali. Pada Gambar 5.3 dapat dilihat hanya standar yang memisah sedangkan sampel tidak memisah.



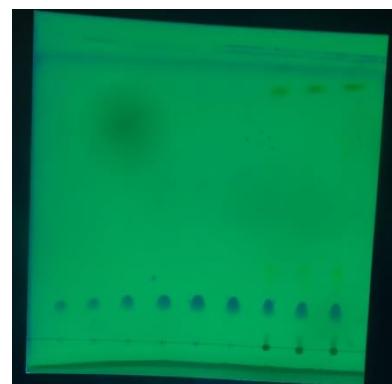
Gambar 5.3 Fase gerak kloroform : metanol (19:1) v/v

Pada percobaan fase gerak yang kedua yaitu menggunakan pelarut etil asetat : metanol : air (100: 13,5: 10) v/v. Pada Gambar 5.4 dapat dilihat bahwa larutan standar yang memisah sedangkan larutan sampel tidak memisah.



Gambar 5.4 Fase gerak etil asetat : metanol : air (100: 13,5: 10) v/v

Namun fase gerak yang sesuai dengan penelitian ini adalah kloroform : etanol (99:1) v/v, dikarenakan fase gerak yang sesuai ini dapat memisah dengan baik. Dapat dilihat pada Gambar 5.5 telah membuktikan bahwa fase gerak tersebut dapat memisah dengan baik antara standar maupun sampel.



Gambar 5.5 Hasil penotolan larutan standar dan sampel pada lempeng KLT

Keterangan :

Fase gerak : kloroform : etanol (99 : 1) v/v

Fase diam : silika gel F₂₅₄

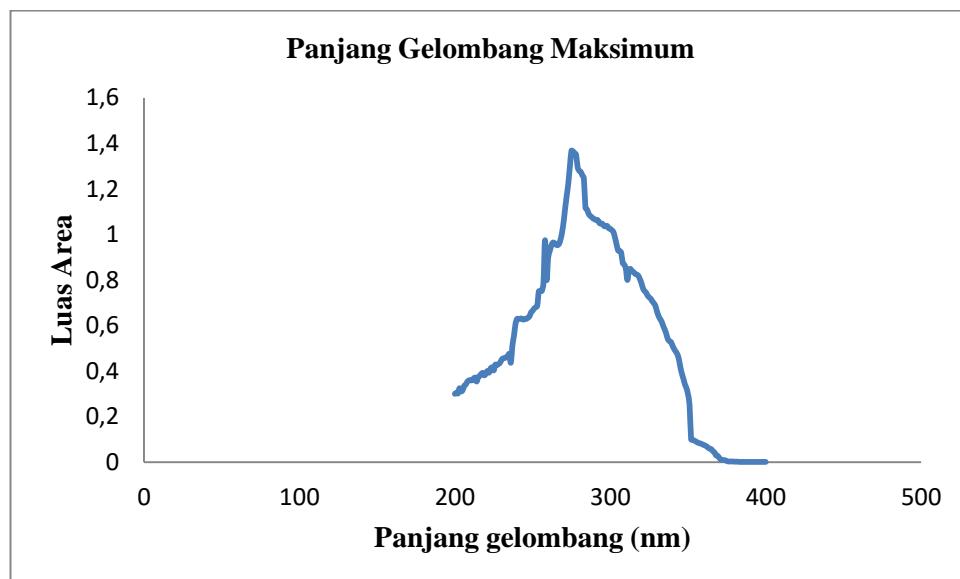
Bercak standar: standar 1,2,3,4,5, dan 6 (kiri ke kanan)

Bercak sampel: sampel 7,8, dan 9 (kiri ke kanan)

Deteksi : UV 254 nm

b. Penentuan panjang gelombang

Untuk mengetahui panjang gelombang maksimum pada penelitian ini dilakukan dengan pembacaan pada panjang gelombang 200 – 400 nm terlebih dahulu. Kemudian diukur pada spektrum dan dilihat panjang gelombang maksimumnya. Dapat dilihat pada Gambar 5.6



Gambar 5.6 Panjang gelombang maksimum 275 nm

c. Penentuan konsentrasi

Pada penelitian ini menggunakan konsentrasi awal sebesar 200; 250; 300; 350; 400; dan 450 ppm, dilakukan penotolan sebanyak 2 μ l ke dalam lempeng KLT. Dihasilkan nilai Rf terlalu kecil, kemudian dilakukan dengan cara menaikkan konsentrasi agar didapat Rf yang sesuai. Berikut konsentrasi yang akan didapatkan pada penelitian ini adalah sebesar 400; 600; 800; 1000; 1200; dan 1400 ppm.

5.2.2 Penetapan kadar kafein ekstrak metanol teh hitam

Pada penelitian ini didapatkan hasil nilai kadar kafein pada ekstrak metanol teh hitam. Berdasarkan pengukuran tersebut, dapat dilihat pada Tabel 5.3

Tabel 5.3 Hasil pengukuran kadar kafein

Replikasi	AUC	Kadar % b/b
I	0,01893	0,91469
II	0,01334	0,47933
III	0,01309	0,44974
Kadar rata-rata	0,61458 %b/b	
SD	0,259	
RSD	42,14%	

BAB 6. PEMBAHASAN PENELITIAN

Pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometri dengan fase gerak yang terdiri dari kloroform: etanol (99:1) dan fase diam silika gel F₂₅₄. Pada rangkaian penelitian ini telah dilakukan optimasi kondisi analisis diantaranya optimasi fase gerak, optimasi konsentrasi, dan optimasi panjang gelombang maksimum.

6.1 Optimasi kondisi analisis kafein ekstrak metanol teh hitam

Identifikasi kualitatif dilakukan dengan metode KLT karena mudah dilakukan dan sederhana, serta tidak membutuhkan jumlah pelarut dan sampel yang banyak. Tujuan identifikasi kualitatif ini adalah untuk mengetahui ada dan tidaknya kafein dalam sampel. Sampel yang dimaksud disini adalah ekstrak metanol teh hitam. Fase diam yang digunakan merupakan fase diam dengan sistem fase normal, mengandung gugus OH yang terikat pada gugus silanol. Fase normal adalah suatu sistem kromatografi yang menggunakan fase diam yang bersifat lebih polar dibanding fase gerak (Sethi, 1996). Fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄ yang bersifat polar dan berfosforesensi pada UV 254 nm. Menurut Jork (1990), F pada F₂₅₄ berarti fosforesensi, menunjukkan adanya indikator fosforesensi anorganik sehingga pada panjang gelombang 254 nm fase diam ini akan berfosforesensi. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform : etanol (99 : 1) v/v karena merupakan fase gerak yang sesuai untuk identifikasi alkaloid.

Standar yang digunakan adalah kafein murni karena syarat suatu standar adalah murni atau tunggal yaitu hanya mengandung satu jenis senyawa saja serta

strukturnya sama atau mirip dengan senyawa yang diuji. Deteksi yang digunakan adalah UV 254 nm yang merupakan metode deteksi fisik.

Optimasi kondisi analisis merupakan suatu optimasi yang dilakukan untuk mendapatkan pemisahan yang baik menggunakan metode kromatografi. Setelah dilakukan optimasi diharapkan akan didapatkan kondisi analisis yang optimum. Pemilihan kondisi analisis yang optimum dilihat berdasarkan penilaian parameter efisiensi kromatografi, antara lain: nilai R_s , nilai N , dan H (Wulandari, 2011). Optimasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah optimasi konsentrasi, optimasi penjang gelombang maksimum, dan optimasi fase gerak.

6.1.1 Optimasi konsentrasi

Optimasi konsentrasi uji dibuat menggunakan enam titik konsentrasi uji. Penentuan konsentrasi uji didasarkan pada hasil dari optimasi eluen, dimana hasil tersebut menunjukkan perkiraan kandungan kafein pada ekstrak metanol teh hitam. Pembuatan sampel uji dibuat dengan cara menimbang sejumlah tertentu ekstrak metanol teh hitam lalu dilarutkan dalam kloroform sedangkan pembuatan larutan standar dibuat dengan cara melarutkan standar kafein menggunakan kloroform. Larutan standar dan sampel kemudian ditotolkan pada lempeng KLT untuk selanjutnya dilakukan eluasi menggunakan eluen dan pada panjang gelombang yang telah dioptimasi. Konsentrasi uji yang dapat dipilih adalah konsentrasi yang mempunyai nilai N paling besar dan nilai H paling kecil dan kemudahan dalam pembuatan sampel.

6.1.2 Optimasi panjang gelombang maksimum

Pemilihan panjang gelombang maksimum sangat menentukan dalam penelitian, karena pada panjang gelombang maksimum memiliki kepekaan maksimal dan pada panjang gelombang maksimum tersebut perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi larutan adalah yang paling besar. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari hasil scanning adalah 275 nm, artinya panjang gelombang larutan standar maupun sampel memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 275 nm. Bentuk struktur molekul kafein memiliki ikatan rangkap dua, dimana bagian tersebut dapat bertanggung jawab menyerap cahaya yang disebut dengan kromofor. Semakin panjang ikatan rangkap dua atau rangkap tiga terkonjugasi di dalam molekul, molekul tersebut akan lebih mudah menyerap cahaya (Cairns, 2008). Selain itu, gugus fungsi seperti, -O-, -NH₂ dan -OCH₃ yang disebut dengan gugus auksokrom yang memberikan transisi n menjadi π^* . Gugus auksokrom adalah gugus yang tidak dapat menyerap radiasi ultraviolet sinar tampak, apabila gugus ini terikat pada gugus kromofor mengakibatkan pergeseran panjang gelombang ke arah yang lebih besar atau pergeseran batokromik. Panjang gelombang serapan maksimum kafein dalam pelarut asam encer yaitu 273 nm (Clarke, 1986). Terdapat perbedaan sebesar 2 nm antara spektra absorbsi maksimum kafein hasil pengamatan dan literature, namun menurut Farmakope Indonesia IV toleransi yang diperbolehkan maksimum 2 nm. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa senyawa yang diamati benar-benar kafein.

6.1.3 Optimasi fase gerak

Tujuan dari penentuan komposisi eluen optimum adalah untuk mendapatkan perbandingan komposisi volume eluen terbaik agar diperoleh hasil pemisahan yang maksimal. Perbandingan komposisi sangat mempengaruhi hasil pemisahan. Sifat kafein yang nonpolar akan lebih cenderung berinteraksi dengan fase gerak nonpolar, oleh karena itu perbandingan komposisi eluen yang dipilih menggunakan komposisi eluen nonpolar lebih besar yaitu dimana komposisi kloroform lebih besar daripada etanol. Komposisi fase gerak yang lebih besar akan berinteraksi dengan senyawa kafein, sehingga proses pemisahan senyawa kafein pada lempeng KLT akan lebih mudah tampak pada bentuk spot pada lempeng.

Optimasi fase gerak dilakukan dengan cara melarutkan standar kafein dan sampel pada konsentrasi tertentu. Selanjutnya ditotolkan standar dan sampel pada lempeng sebanyak 20 μl . Lempeng dieluasi menggunakan masing-masing eluen . setelah dilakukan eluasi, lempeng di *scanning* pada panjang gelombang 275 nm. Eluen yang digunakan untuk optimasi eluen adalah kloroform : etanol (99:1) v/v. eluen yang dipilih adalah eluen yang mempunyai nilai *theoritical plate number* (N) paling besar, nilai *height equivalent a theoritical plate* (HETP) paling kecil, nilai resolusi (R_s) $> 1,5$ dan dapat menghasilkan puncak kromatogram yang simetris (Wulandari, 2016).

6.2 Penetapan kadar kafein ekstrak metanol teh hitam

Pada penetapan kadar kafein digunakan sampel dengan 3 kali replikasi dengan konsentrasi awal 768; 792; dan 812 ppm. Tiga kali replikasi sampel

tersebut dieluasi menggunakan fase gerak kloroform : etanol (99:1) sedangkan fase diam berupa silika gel F₂₅₄ dan dilakukan pengukuran pada spektrum 200 – 400 lalu didapatkan panjang gelombang maksimum 275 nm dengan Camag densitometer sehingga didapatkan data berupa luas area dibawah kurva atau AUC. Pada rangkaian penelitian ini telah dilakukan penetapan kadar kafein teh hitam diantaranya yaitu ekstraksi maserasi, skrinning kimia, serta analisa ekstrak metanol teh hitam menggunakan densitometer.

Penyarian serbuk daun dilakukan dengan proses maserasi. Memilih metode maserasi karena sederhana dan mudah dilakukan. Pada proses maserasi, penyarian dilakukan selama 24 jam dan dilakukan maserasi secara triplo. Pada penyarian ini menggunakan pelarut metanol dikarenakan daun teh mengandung kafein dalam bentuk basa bebas yang dapat larut dalam pelarut organik. Kusumaningtyas *et al.*, (2008) metanol merupakan pelarut polar yang dapat melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat polar seperti golongan fenol. Prinsip proses maserasi adalah terjadinya perbedaan konsentrasi antara kandungan kimia di dalam sel daun yang disari dengan kandungan kimia yang berada di luar sel. Pelarut akan masuk ke dalam sel daun dan karena ada perbedaan konsentrasi antara kandungan kimia di dalam sel daun dengan kandungan kimia di luar sel daun. Kandungan kimia di dalam daun akan tersari oleh pelarut dan keluar dari dalam sel daun. Pada saat maserasi dilakukan pengadukan sesekali yang berfungsi untuk meratakan konsentrasi larutan di luar butir serbuk simplisia, sehingga dengan pengadukan tersebut tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam sel dengan larutan diluar sel

(Anonim, 1986). Ekstrak hasil proses maserasi berupa ekstrak metanol kering. Ekstrak metanol sudah dilakukan penguapan di *waterbath* dengan suhu 64,7⁰ C sesuai dengan titik didih metanol. Selain itu, fungsi dari menjaga dan mengatur suhu adalah untuk menjaga stabilitas kandungan kimia. Apabila suhu terlalu tinggi kemungkinan kandungan kimia di dalam teh hitam akan rusak. Proses ekstraksi dilakukan secara 3 kali replikasi menggunakan bahan serbuk teh hitam sebanyak 5 gram. Berdasarkan hasil ekstraksi diperoleh ekstrak kering teh hitam yang tidak dapat dituang dan beraroma khas sebanyak 1,2847 gram; 1,3318 gram; dan 1,6301 gram, dapat dilihat pada tabel 5.1

Pengujian senyawa kafein salah satunya menggunakan reagen parry, yaitu apabila sejumlah zat dilarutkan ke dalam alkohol, kemudian ditambahkan reagen Parry, dan ammonia encer, larutan berwarna biru tua atau hijau menyatakan terdapat kafein (Depkes, 1995). Berdasarkan hasil pengujian, sampel kafein standar dan sampel ekstrak metanol teh hitam yang diuji menggunakan reagen Parry yang merupakan pereaksian menggunakan alkohol, ammonia encer, dan reagen Parry menghasilkan warna hijau. Hal tersebut menunjukkan adanya kafein didalam standar dan sampel ekstrak metanol teh hitam. Warna hijau yang dihasilkan tersebut berasal dari reaksi antara ion kobalt (Co) yang bermuatan dua positif dalam reagen Parry yang mengikat gugus nitrogen yang ada didalam senyawa kafein. Reagen Parry dibuat dengan mereaksikan Kobalt Nitrat [Co(NO₃)₂] dengan metanol. reaksi tersebut membentuk senyawa kompleks berwarna hijau (Maramis, 2013). Hasil uji reagen Parry dapat dilihat pada gambar

Aktivasi lempeng KLT silika gel F₂₅₄ dilakukan di dalam oven pada suhu 120⁰C selama 45 menit untuk menghilangkan kelembapan serta kemungkinan kandungan air pada lempeng silika. Menurut Spangenberg, Poole dan Weins (2011) gugus silanol pada silika gel mampu membentuk hingga tiga *layer* ikatan dengan air, sehingga suhu aktivasi dilakukan pada suhu $\geq 120^0$ C dan $\leq 180^0$ C. Bejana (*chamber*) yang digunakan dalam penelitian adalah bejana CAMAG *flat bottom chamber* dengan ukuran 20 x 20 cm dengan penutup *stainless steel*. Proses penjenuhan bejana (*chamber*) dilakukan mengacu pada Farmakope V (2014) yakni didiamkan selama kurang lebih 1 jam atau hingga fase gerak membasahi 7/8 tinggi kertas saring.

Hasil identifikasi kualitatif dengan KLT menunjukkan bahwa sampel mengandung kafein, selanjutnya dilakukan identifikasi secara kuantitatif menggunakan *TLC densitometry scanner*. Alat ini menggunakan prinsip densitometri dimana kerapatan kromatogram senyawa uji yang dipisahkan diukur dan dibandingkan dengan kerapatan kromatogram senyawa standar yang dielusi bersama-sama (Hardjono, 1983). Metode KLT-densitometri dipilih karena kafein memiliki gugus kromofor yang bertanggungjawab atas penyerapan energi radiasi sinar UV. Sumber radiasi yang digunakan pada penelusuran kafein adalah lampu deuterium karena lampu ini menghasilkan radiasi pada panjang gelombang 160 – 380 nm.

Pada penelitian ini digunakan konsentrasi 6 seri standar dengan konsentrasi yang berbeda-beda yaitu 400; 600; 800; 1000; 1200; 1400 ppm setelah melalui rangkaian optimasi. Tujuan pembuatan kurva baku ini adalah

untuk mendapatkan persamaan regresi linier yang selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar kafein dalam ekstrak metanol teh hitam. Masing-masing larutan standar ditotolkan pada lempeng KLT silika gel F₂₅₄ sebanyak 2 µl dan dielusi dengan eluen optimal yaitu campuran kloroform : etanol (99:1) sampai tanda batas, kemudian dianalisis menggunakan densitometer.

Angka rf berjangka antara 0,00 sampai 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal (Stahl, 1985). Pada penelitian ini nilai rf telah memenuhi syarat. Pembuatan kurva baku dilakukan untuk mencari persamaan regresi linier dengan nilai r terbesar, yang paling mendekati 1. Enam seri standar tersebut dieluasi menggunakan fase gerak dan fase diam yang sama dengan identifikasi kualitatif, dan dilakukan pengukuran AUC 6 seri standar pada panjang gelombang 275 nm dengan *TLC densitometry scanner* sehingga didapatkan data kurva baku berupa luas area dibawah kurva atau AUC.

Berdasarkan hasil perhitungan statistik regresi linear diperoleh persamaan kurva kalibrasi $y = 8,6622 \times 10^{-6} \cdot X + 6,7632 \times 10^{-3}$, di mana x adalah massa kafein dan y adalah luas area yang diperoleh dari densitometri. Gambar kurva kalibrasi dari 6 titik yang diuji hanya diambil 5 titik saja, karena pada 5 titik tersebut yang menghasilkan garis linear, selain itu pada daerah yang menghasilkan garis linear tersebut merupakan daerah uji.

Berdasarkan pembuatan kurva baku dan setelah dilakukan perhitungan regresi linier, didapat nilai r 0,991, persyaratan untuk nilai r paling baik adalah mendekati nilai 1. Dalam penelitian ini didapatkan persamaan regresi linier yang digunakan adalah $y = 8,6622 \times 10^{-6} \cdot X + 6,7632 \times 10^{-3}$.

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan nilai kadar pada replikasi 1 sebesar 0,91469 mg, pada replikasi 2 sebesar 0,47933 mg dan pada replikasi 3 sebesar 0,44974 mg, dengan mean sebesar 0,61458 mg. Parameter presisi dinyatakan dengan nilai SD atau RSD. Nilai standar deviasi relatif (RSD) sangat fleksibel karena dipengaruhi oleh konsentrasi analit yang akan dianalisis, semakin kecil konsentrasi analit maka semakin besar nilai standar deviasi relatif (RSD) yang diperoleh. Nilai parameter CV atau SD yang diperoleh adalah 0,259. Nilai ini memenuhi syarat presisi yang baik yaitu $< 2\%$ untuk sampel dengan kadar analit kecil (Harmita, 2004). Pada penelitian ini juga didapatkan nilai RSD yaitu 42,14 %. Dari penelitian ini nilai RSD tidak memenuhi persyaratan dikarenakan kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, kondisi laboratorium serta memiliki nilai penyimpangan yang cukup besar pada replikasi 1 dengan penimbangan sampel sebesar 19,2 mg.

Kadar diperoleh dengan memasukkan nilai AUC sampel ke dalam y pada persamaan regresi linier yang telah dipilih sehingga didapatkan nilai x yaitu kadar kafein didalam sampel. Kadar kafein dari ekstrak metanol teh hitam yang diperoleh berdasarkan perhitungan adalah $(0,61458 \pm 0,259) \% \text{ b/b}$. Berdasarkan analisis hasil secara kuantitatif tersebut dapat diketahui bahwa di setiap 20 mg serbuk teh hitam dengan larutan pengekstraksi metanol rata-rata terdapat 0,61458 mg kadar teh hitam.

Menurut Arisandi (2006), setiap 100 gram daun teh hitam mengandung kafein sebesar 2,5 – 4,5 gram, sedangkan menurut hasil penelitian ini setiap 20 mg mengandung 0,61458 mg kafein. Berdasarkan literatur (Arisandi, 2006)

terdapat 4,5% kandungan kafein pada setiap 100 gram teh hitam, sedangkan pada penelitian ini terdapat 3% kandungan kafein pada setiap 20 mg teh hitam. Berdasarkan sampel produk teh hitam dari PTPN XII Lawang yang telah dilakukan penetapan kadar, sampel tersebut memenuhi persyaratan rentang pada literatur Arisandi (2006). Adapun beberapa faktor yang mempengaruhi perbedaan kadar kafein yaitu dipengaruhi oleh tinggi tempat, kondisi tanah, dan cuaca akan mengakibatkan perbedaan kadar kandungan kimia (Anonim, 1995). Menurut Setyamidjaja (2000), penanaman teh pada daerah dataran tinggi terletak pada ketinggian lebih dari 1.200 m dpl (suhu menjadi $18^0 - 19^0$ C) dengan curah hujan 2.000 – 2.500 mm.

Semakin tinggi daerah penanaman teh maka suhu udara akan menjadi semakin rendah. Hal ini diperlukan untuk tanaman teh karena tanaman ini dapat tumbuh dengan baik pada suhu udara yang sejuk. Menurut Setyamidjaja (2000), suhu udara yang baik bagi tanaman teh berkisar $13^0 - 25^0$ C. Selain itu, daerah ini memiliki curah hujan yang tinggi sesuai untuk penanaman teh. Tanaman teh tidak tahan terhadap kekeringan sehingga memerlukan daerah penanaman dengan curah hujan yang cukup tinggi dan merata sepanjang tahun.

Kondisi tanah akan sangat mempengaruhi kandungan kimia yang dihasilkan dalam suatu tanaman karena tanah mengandung unsur hara yang penting untuk proses pembentukan kandungan kimia. Menurut Setyamidjaja (2000), tanaman teh dapat tumbuh dengan baik pada jenis tanah *andosol* (di pulau Jawa), yaitu tanah yang berasal dari bahan vulkanik yang dihasilkan dari

erupsi dan lelehan lahar gunung berapi, sedangkan jenis tanah di daerah Lawang, Malang Jawa Timur sebagai berikut:

Tabel 6.1 Data jenis tanah (Setyamidjaja,2000)

No	Jenis tanah	Luas		Sifat tanah
		Ha	% luas	
1	Andosol	43.783, 42	13,08	Subur, mudah erosi
2	Latosol	86.260, 36	25,77	Tanah subur, tanah erosi potensi untuk tanaman perkebunan
3	Mediteran	55.881, 30	16,67	Mudah kena erosi, umumnya daerah hutan
4	Litosol	69.133, 25	20,65	Mudah kena erosi, umumnya daerah hutan
5	Alluvial	28.003, 25	8,36	Potensi untuk pertanian umumnya daerah hutan
6	Regosol	45.654, 17	13,64	Daerah subur dan potensi untuk pertanian tinggal
7	Brown forest	6.142, 25	1,83	Potensi pertanian rendah, kurang dapat menyerap air

Sumber : RPIJM Kabupaten Malang 2011-2015

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini, dapat ditulis beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Kondisi optimum metode untuk penetapan kadar kafein dalam ekstrak metanol daun teh hitam dengan metode KLT Densitometri yaitu digunakan pelarut metanol; fase diam silika gel F₂₅₄; eluen kloroform : etanol (v/v) = 99 : 1; panjang gelombang 275 nm; konsentrasi 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 ppm.
2. Kadar kafein dalam ekstrak metanol teh hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur setiap 20 mg mengandung 0,61458 mg kafein dengan nilai SD 0,259.

7.2 Saran

Saran yang dapat dipertimbangkan sesuai hasil penelitian ini adalah perlu ada penelitian lebih lanjut mengenai validasi metode analisis KLT-Densitometri terkait dengan analisis dan penetapan kadar kafein menggunakan sampel lain mengandung kafein seperti coklat, permen kopi, teh, dan lain-lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhir, L. T. (2020) ‘Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Kckt) Di Pt Saraswanti Indo Genetech Universitas Islam Indonesia Yogyakarta Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Kckt) Di Pt Saraswanti Indo Genetech’.
- Apriani (2014) ‘BAB II Tinjauan Pustaka_ 2010isa.pdf’, *Apriani*, (1969), pp. 9–66.
- Aranda, M. and Morlock, G. (2007) ‘Simultaneous determination of caffeine, ergotamine, and metamizol in solid pharmaceutical formulation by HPTLC-UV-FLD with mass confirmation by online HPTLC-ESI-MS’, *Journal of Chromatographic Science*, 45(5), pp. 251–255. doi: 10.1093/chromsci/45.5.251.
- Ariel Stanley (2018) ‘Validasi Metode Thin-Layer Chromatography (Tlc) - Densitometri Pada Penetapan Kadar Kafein Dalam Validasi Metode Thin-Layer Chromatography (Tlc) -Densitometri Pada Penetapan Kadar’ , p. 83.
- Arifin, N. L. (2015) ‘Pengaruh Sonikasi Bertahap dalam Proses Degradasi Kitosan terhadap Komposisi Dan Properti Produk’, p. 110. Available at: <http://repository.its.ac.id/59940/>.
- Artanti, A. N. et al. (2016) ‘PERBEDAAN KADAR KAFEIN DAUN TEH (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) BERDASARKAN STATUS KETINGGIAN TEMPAT TANAM DENGAN METODE HPLC’, *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 01(01), pp. 37–44. doi: 10.20961/jpscr.v1i1.690.
- Bayu, S. (2018) ‘Tinjauan Pustaka Tinjauan Pustaka’, *Convention Center Di Kota Tegal*, 4(80), p. 4.
- Danasrayaningsih, V. S. (2015) ‘Penetapan Kadar Kafein Dalam Minuman Berenergi Merek “X” Dengan Metode Spektrofotometri Derivatif Aplikasi Peak-To-Peak’, (3), pp. 4–5.
- Ermawati, Y. H. (2007) ‘1 Penetapan Kadar Kafein Minuman Teh Instan Dengan Metode Spektrofotometri-Uv Derivatif Aplikasi’, pp. 1–71.

- Fahmi Arwangga, A., Raka Astiti Asih, I. A. and Sudiarta, I. W. (2016) ‘Analisis Kandungan Kafein Pada Kopi Di Desa Sesao Narmada Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis’, *Jurnal Kimia*, 10(1), pp. 110–114. doi: 10.24843/jchem.2016.v10.i01.p15.
- Fatoni, A. (2015) ‘Analisa Secara Kualitatif dan Kuantitatif Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk Lokal yang Beredar di Kota Palembang Menggunakan Spektrofotometri UV-VIS’, *Analisa Secara Kualitatif Dan Kuantitatif Kadar Kafein Dalam Kopi Bubuk Lokal Yang Beredar Di Kota Palembang Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis*, 84, pp. 487–492. Available at: <http://ir.obihiro.ac.jp/dspace/handle/10322/3933>.
- Hadi, A. K. (2009) ‘Pengaruh Persepsi Nilai Konsumen Terhadap Perilaku Pembelian Private Label Studi Kasus : Giant Hypermarket Poins Square Lebak Bulus’, *Skripsi Universitas Indonesia*, pp. 1–8.
- Harun, S. et al. (2014) ‘Seduhan Yang Beredar Di Pasaran Secara KLT - Densitometri’, 4(1), pp. 43–45.
- Ii, B. A. B. and Pustaka, T. (2015) ‘et al ., 2013).’, pp. 5–21.
- Inayah, I., Hadisoebroto, G. and Kashuri, M. (2019) ‘Optimasi Metode Penetapan Kadar Kafein Pada Beberapa Serbuk Minuman Energi Yang Beredar Di Kota Serang’, *Jurnal Sabdariffarma*, 1(1), pp. 1–7. doi: 10.53675/jsfar.v1i1.16.
- Januarti, I. B. (2020) ‘K LT-Densitometer’, *Power Point*.
- Jaya, I. G. N. I. P., Leliqia, N. P. E. and Widjaja, I. N. K. (2009) ‘Uji Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH Ekstrak Produk Teh Hitam (*Camellia sinensis* (L.) O.K.) dan Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) Serta Profil KLT-Densitometernya’, *Uji Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH Ekstrak Produk Teh Hitam dan Gambir*, pp. 86–101.
- Karakteristik, A., Budidaya, P. and Laut, R. (2009) ‘Masrasi 2’, pp. 7–25.
- Komes, D. et al. (2009) ‘Determination of caffeine content in tea and maté tea by using different methods’, *Czech Journal of Food Sciences*, 27(SPEC. ISS.), pp. 213–216. doi: 10.17221/612-cjfs.
- Laily, S. (2016) *Analisis Kafein Pada Daun Kopi Arabika (Coffea arabica) Dan Robusta (Coffea canephora) Menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis*

- Densitometri, Syarifatul Laily.*
- Lany, A. (2017) ‘Hubungan Konsumsi Kafein Terhadap Kualitas Tidur dan Tekanan Darah pada Karyawan Restoran Cepat Saji di Kota Padang’, (2013), pp. 1–6. Available at: scholar.unand.ac.id.
- MELIALA, D. I. P. (2020) ‘Penetapan Kadar Kafein Pada Bubuk Teh Hitam Yang Beredar Di Pasar Deli Tua Menggunakan Spektrofotometri Uv’, *Jurnal Penelitian Farmasi & Herbal*, 3(1), pp. 21–28. doi: 10.36656/jpfh.v3i1.313.
- Nathan, A. J. and Scobell, A. (2012) ‘BAB II TINJAUAN PUSTAKA Vertigo’, *Foreign Affairs*, 91(5), pp. 1689–1699.
- Novita, L. and Aritonang, B. (2017) ‘Penetapan kadar kafein pada minuman berenergi sediaan sachet yang beredar di sekitar pasar petisah medan’, *Jurnal Kimia Saintek dan Pendidikan*, I(1), pp. 37–42.
- Oellig, C., Schunck, J. and Schwack, W. (2018) ‘Determination of caffeine, theobromine and theophylline in Mate beer and Mate soft drinks by high-performance thin-layer chromatography’, *Journal of Chromatography A*, 1533, pp. 208–212. doi: 10.1016/j.chroma.2017.12.019.
- Perlakuan, A. et al. (2020) ‘Analisis perlakuan akuntansi aset biologis menurut psak 69 agrikultur dan ias 41 agriculture pada pt. perkebunan nusantara xii kebun teh wonosari’.
- Pratita, A. T. K. (2018) ‘Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Alkaloid Dari Berbagai Ekstrak Kopi Robusta (Coffea canephora)’, *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-ilmu Keperawatan, Analis Kesehatan dan Farmasi*, 17(2), p. 198. doi: 10.36465/jkbth.v17i2.222.
- Riyanti, E., Silviana, E. and Santika, M. (2020) ‘Analisis Kandungan Kafein Pada Kopi Seduhan Warung Kopi Di Kota Banda Aceh’, *Lantanida Journal*, 8(1), p. 1. doi: 10.22373/lj.v8i1.5759.
- Rosidah (2018) ‘Teori KLT’, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), pp. 8–24.
- Saputri, N. D. (2014) ‘Analisis Kadar Flavonoid Pada Benalu Kopi (Dendrophthoe pentandra (L.) Miq.) menggunakan Teknik Kromatografi Lapis

- Tipis-Densitometri', *Digital Repository Universitas Jember*, p. 100. Available at: [http://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/75992/Dian Pratiwi - 132310101064 -1.pdf?sequence=1](http://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/75992/Dian%20Pratiwi%20-132310101064-1.pdf?sequence=1).
- Sari, A. I. N. and Kuntari, K. (2019) 'Penentuan Kafein dan Parasetamol dalam Sediaan Obat Secara Simultan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis', *IJCA (Indonesian Journal of Chemical Analysis)*, 2(01), pp. 20–27. doi: 10.20885/ijca.vol2.iss1.art3.
- Savitri, A. and Megantara, S. (2019) 'Metode KLT-Densitometri sebagai Penetapan Kadar Bahan Aktif Sediaan Farmasi', *Farmaka*, 17, pp. 455–463.
- Sherma, J. (2000) 'Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis', *Journal of Chromatography A*, 880(1–2), pp. 129–147. doi: 10.1016/S0021-9673(99)01132-2.
- Soni, M. (2019) 'Extraction and analysis of Caffeine from various brands of tea leaves marketed in India', ~ 119 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1), pp. 119–120.
- Susanto, H., Indra, M. R. and Karyono, S. (2012) 'Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam (*Camellia sinensis*) terhadap Ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR α pada Jalur MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) Jaringan Lemak Viseral Tikus Wistar dengan Diet Tinggi Lemak', *The Journal of Experimental Life Sciences*, 2(2), pp. 89–97. doi: 10.21776/ub.jels.2012.002.02.05.
- Sutipno, D. H. (2019) 'Penentuan Kadar Kafein Pada Sampel Teh Di Pasaran Menggunakan Metode Nir-Kemometrik', pp. 1–45.
- Suwiyarsa, I. N., Nuryanti, S. and Hamzah, B. (2018a) 'Analisis Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk Lokal yang Beredar di Kota Palu', *Jurnal Akademika Kimia*, 7(4), p. 189. doi: 10.22487/j24775185.2018.v7.i4.11943.
- Suwiyarsa, I. N., Nuryanti, S. and Hamzah, B. (2018b) 'Analisis Kadar Kafein Dalam Kopi Bubuk Lokal Yang Beredar Di Kota Palu Analysis of Caffeine Level in Local Coffee Powder that Circulates in Palu City *I Nyoman Suwiyarsa, Siti Nuryanti, dan Baharuddin Hamzah', 7(November), pp. 189–192.
- Syahila, P. N. (2018) 'Pengaruh Suhu Dan Waktu Ekstraksi Terhadap Kadar

- Kafein Dalam Teh Hijau Produksi Kemuning’, *Laporan Tugas Akhir*, p. 38.
- Teh, A. T. (2013) ‘Bl013562’, pp. 6–23.
- Utara, U. S. (2009) ‘Universitas Sumatera Utara’, pp. 1–3.
- Wibo, I. M. (2010) ‘Identifikasi Kandungan Kafein dalam Ekstrak Etanolik Daun Teh (*Camellia sinensis* L.) dari Daerah Boyolali dengan Metode KLT-Densitometri’, *Skripsi, Yogyakarta : Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma*.
- Wilantari, P. D. (2018) ‘Isolasi Kafein Dengan Metode Sublimasi Dari Dengan Fraksi Etil Asetat Serbuk Daun Camelia Sinensis’, *Jurnal Farmasi Udayana*, 8(1), p. 53. doi: 10.24843/jfu.2018.v07.i02.p03.
- Wulandari, L. (2011) *Kromatografi Lapis Tipis, Taman Kampus Presindo*.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal penyusunan naskah skripsi

No	Kegiatan	Okt	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Juni	Juli	Ags
1	Penyusunan proposal skripsi											
	a. Bimbingan											
	b. Revisi											
	c. Fiksasi proposal											
2	Seminar proposal skripsi											
3	Tahap penyiapan bahan											
4	Tahap pelaksanaan penelitian											
5	Tahap penyusunan hasil skripsi											
	a. bimbingan dan revisi											
6	Seminar hasil skripsi											

Lampiran 2. Dokumentasi penelitian

Gambar	Keterangan
	Populasi yang digunakan yaitu produk teh hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur
	Proses ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol
	Ekstrak kering metanol teh hitam
	Skrining kimia menggunakan reagen parry

		Proses ekstraksi cair-cair
		Penjenuhan chamber
		Hasil penotolan pada lempeng KLT
		Instrumen yang digunakan adalah Camag densitometer dengan <i>software</i> visionCATS

Lampiran 3. Perhitungan ekstraksi maserasi

Percobaan	Menimbang
I	5 gram dalam 250 ml metanol
II	5 gram dalam 250 ml metanol
III	5 gram dalam 250 ml metanol

Berat cawan kosong 1 = 63, 8024 gram

Berat cawan kosong 2 = 58, 1205 gram

Berat cawan kosong 3 = 70, 0750 gram

Hasil ekstrak kering	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
Berat serbuk awal (g)	5,0895	5,0670	5, 0278
Berat cawan kosong (g)	63,8024	58,1205	70,0750
Berat cawan + ekstrak kering (g)	65,0871	59,4523	71,7051
Berat ekstrak kering (g)	1,2847	1,3318	1,6301
% Rendemen	25,24	26,28	32,42
(Rata –rata ekstrak kering (g) ± (Rata-rata % rendemen) ± SD	$(1,4156 \pm 27,98\%) \pm 5,1830 \times 10^{-10}$		

Lampiran 4. Perhitungan optimasi konsentrasi kurva baku

Larutan Induk

$$\frac{200 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} \times 1000 \text{ mg/L} = 2000 \text{ ppm}$$

Larutan Standar

Digunakan rumus pengenceran => $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$

- 1) 400 ppm, 5 ml = 1 ml
- 2) 600 ppm, 5 ml = 1,5 ml
- 3) 800 ppm, 5 ml = 2 ml
- 4) 1000 ppm, 5 ml = 2,5 ml
- 5) 1200 ppm, 5 ml = 3 ml
- 6) 1400 ppm, 5 ml = 3,5 ml

Larutan Sampel

- 1) $\frac{19,2 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \text{ mg/L} = 768 \text{ ppm}$
- 2) $\frac{19,8 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \text{ mg/L} = 792 \text{ ppm}$
- 3) $\frac{20,3 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \text{ mg/L} = 812 \text{ ppm}$

Diketahui persamaan regresi:

$$a = 6,7632 \times 10^{-3}$$

$$b = 8,6622 \times 10^{-6}$$

$$r = 0,991$$

$$y = 8,6622 \times 10^{-6} \cdot X + 6,7632 \times 10^{-3}$$

Lampiran 5. Perhitungan penetapan kadar kafein ekstrak metanol teh hitam

Sampel 1

$$y_1 = 0,01893 \text{ ng}$$

$$y = 8,6622 \times 10^{-6} \cdot X + 6,7632 \times 10^{-3}$$

$$0,01893 = 8,6622 \times 10^{-6} \cdot X + 6,7632 \times 10^{-3}$$

$$X = \frac{0,01893 - 6,7632 \times 10^{-3}}{8,6622 \times 10^{-6}}$$

$$= \frac{12,17 \times 10^{-3}}{8,6622 \times 10^{-6}}$$

$$= 1,40495 \times 10^3 \text{ ng dalam } 2 \mu\text{l} (2 \times 10^{-3} \text{ ml})$$

$$= \frac{12,17 \times 10^{-3}}{2 \times 10^{-3}}$$

$$= 0,70248 \cdot 10^6 \text{ ng} \times 25 \text{ ml}$$

$$= 17,562 \times 10^6 \text{ ng}$$

$$= 17,562 \text{ mg}$$

$$= \frac{17,562 \text{ mg}}{19,2 \text{ mg}}$$

$$= 0,91469$$

$$\text{Kadar ppm} = \frac{17,562 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \text{ ppm}$$

$$= 702,48 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{702,48 \text{ ppm}}{768 \text{ ppm}} \times 100 \%$$

$$= 91,46 \%$$

Sampel 2

$$y_2 = 0,01334 \text{ ng}$$

$$y = 8,6622 \times 10^{-6} \cdot X + 6,7632 \times 10^{-3}$$

$$0,01334 = 8,6622 \times 10^{-6} \cdot X + 6,7632 \times 10^{-3}$$

$$\begin{aligned}
 X &= \frac{0,01334 - 6,7632 \times 10^{-3}}{8,6622 \times 10^{-6}} \\
 &= \frac{6,5768 \times 10^{-3}}{8,6622 \times 10^{-6}} \\
 &= 0,75926 \times 10^3 \text{ ng dalam } 2 \mu\text{l} (2 \times 10^{-3} \text{ ml}) \\
 &= \frac{0,75926 \times 10^3}{2 \times 10^{-3}} \\
 &= 0,37962 \cdot 10^6 \text{ ng} \times 25 \text{ ml} \\
 &= 9,49075 \times 10^6 \text{ ng} \\
 &= 9,49075 \text{ mg} \\
 &= \frac{9,49075 \text{ mg}}{19,8 \text{ mg}} \\
 &= 0,47933
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar ppm} &= \frac{19,49075 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \text{ ppm} \\
 &= 379,63 \text{ ppm} \\
 \% \text{ recovery} &= \frac{379,63 \text{ ppm}}{792 \text{ ppm}} \times 100 \% \\
 &= 47,93 %
 \end{aligned}$$

Sampel 3

$$\begin{aligned}
 y_3 &= 0,01309 \text{ ng} \\
 y &= 8,6622 \times 10^{-6} \cdot X + 6,7632 \times 10^{-3} \\
 0,01309 &= 8,6622 \times 10^{-6} \cdot X + 6,7632 \times 10^{-3} \\
 X &= \frac{0,01309 - 6,7632 \times 10^{-3}}{8,6622 \times 10^{-6}} \\
 &= \frac{6,3268 \times 10^{-3}}{8,6622 \times 10^{-6}} \\
 &= 0,73039 \times 10^3 \text{ ng dalam } 2 \mu\text{l} (2 \times 10^{-3} \text{ ml}) \\
 &= \frac{0,73039 \times 10^3}{2 \times 10^{-3}}
 \end{aligned}$$

$$= 0,36519 \cdot 10^6 \text{ ng} \times 25 \text{ ml}$$

$$= 9,12975 \times 10^6 \text{ ng}$$

$$= 9,12975 \text{ mg}$$

$$= \frac{9,12975 \text{ mg}}{19,8 \text{ mg}}$$

$$= 0,44974$$

$$\text{Kadar ppm} = \frac{9,12975 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \text{ ppm}$$

$$= 365,19 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{365,19 \text{ ppm}}{812 \text{ ppm}} \times 100 \%$$

$$= 44,97 \%$$

$$\% \text{ kadar rata-rata} = \frac{184,36 \%}{3} = 61,45 \%$$

$$\text{SD} = \frac{\sqrt{(0,91469 - 0,61458)^2 + (0,47933 - 0,61458)^2 + (0,44974 - 0,61458)^2}}{3-1}$$

$$= \frac{\sqrt{(0,090) + (0,018) + (0,027)}}{2}$$

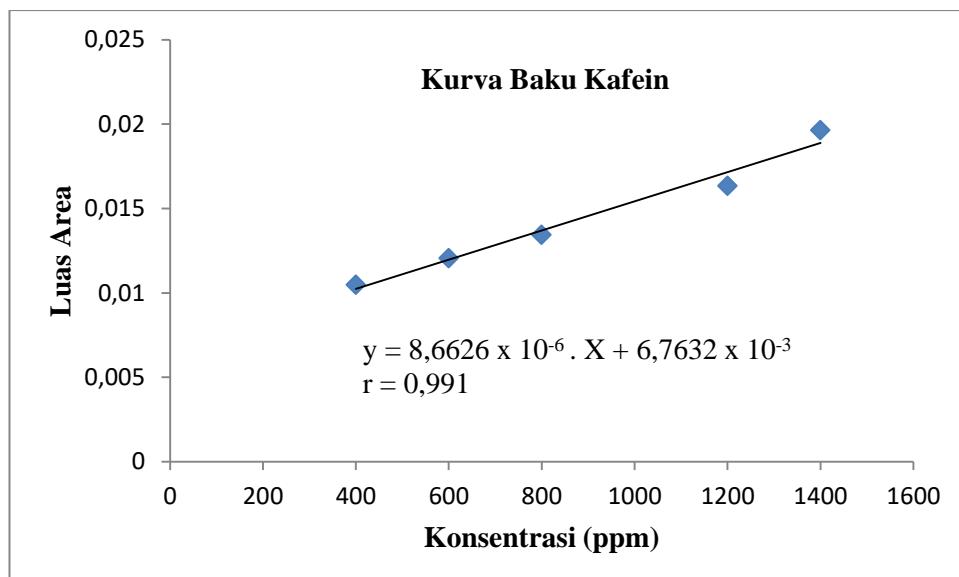
$$= \frac{\sqrt{0,135}}{2}$$

$$= \sqrt{0,0675}$$

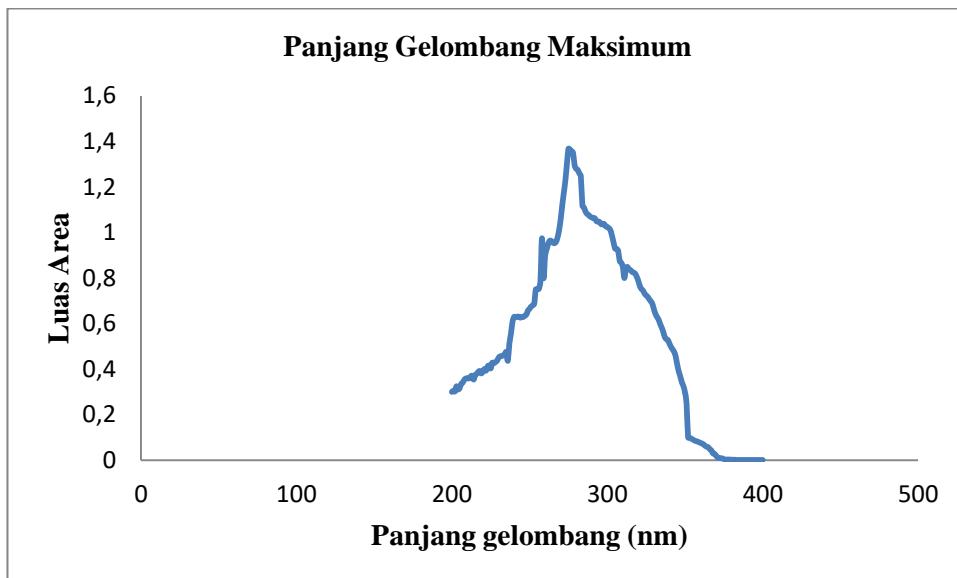
$$= 0,259$$

$$\text{RSD} = \frac{0,259}{0,61458} \times 100 \%$$

$$= 42,14 \%$$

Lampiran 6. Kurva baku kafein

Lampiran 7. Panjang gelombang maksimum kafein 275 nm



Lampiran 8. Hasil output dari KLT Densitometri

Analysis: REZA DIAR_20210430_144022

Path: Home/Universitas

Based on method: REZA DIAR

Created	30-Apr-2021 14:40:23	visionCATSuser
Modified	04-Aug-2021 09:38:52	visionCATSuser
Last HPTLC log	04-Aug-2021 09:38:52	Analysis modified
Explorer notes		

Track	Vial ID	Description	Volume	Position	Type
1	S1	std 1	2.0 µl	N/A	Reference
2	S2	std 2	2.0 µl	N/A	Reference
3	S3	std 3	2.0 µl	N/A	Reference
4	S4	std 4	2.0 µl	N/A	Reference
5	S5	std 5	2.0 µl	N/A	Reference
6	S6	std 6	2.0 µl	N/A	Reference
7	SP 1	smpl 1	2.0 µl	N/A	Sample
8	SP 2	smpl 2	2.0 µl	N/A	Sample
9	SP 3	smpl 3	2.0 µl	N/A	Sample

Track Assignment notes

A track marked with means: the application type is overridden in some evaluation(s).

System setup:

Software	Server DESKTOP-9FP6PG6, version 3.0.20196.1
Chamber	N/A
Manual application	N/A
TLC Scanner 4	S/N:270739

Chromatography

Lempenge layout:

Stationary phase	Merck, HPTLC Silica gel 60 F ₂₅₄
Lempenge format	90 x 100 mm
Application type	User
Application	Position Y: 10.0 mm, length: 5.0 mm, width: 0.0 mm
Track	First position X: 10.0 mm, distance: 8.0 mm
Solvent front position	90 mm
Notes	

Application 1 - Manual application:

Notes

Development 1 - Chamber:

Tank	Other
Mobile phase	Chloroform : Ethanol = 9 : 1
Saturation time	20 min
Use saturation pad	True
Use smartALERT	False
Volume front through	0 ml
Volume rear through	0 ml
Drying time	5 min
Drying temperature	Room temperature
Notes	

Scan developed lempenge 1a - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):

Scanner type	Single λ
Optimization for	Resolution
Measurement mode	Absorbance
Filter	n/a
Detector mode	Automatic
Scanning speed	20 mm/s
Data resolution	100 $\mu\text{m}/\text{step}$
Slit	10 x 0.2 mm, macro
Partial scan	No
Lamp	Deuterium
Wavelength(s) 	254 nm
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Step status	Step was restored
Documentation step label	
Notes	

Scan developed lempenge 1b - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):

Scanner type	Single λ
Optimization for	Resolution
Measurement mode	Absorbance
Filter	n/a
Detector mode	Automatic
Scanning speed	20 mm/s
Data resolution	100 $\mu\text{m}/\text{step}$
Slit	10 x 0.2 mm, macro
Partial scan	No
Lamp	Deuterium
Wavelength(s)	254 nm
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Step status 	Step was restored
Documentation step label	
Notes	

Scan developed lempenge 1c - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):

Scanner type	Single λ
Optimization for	Resolution
Measurement mode	Absorbance
Filter	n/a
Detector mode	Automatic
Scanning speed	20 mm/s
Data resolution	100 μm /step
Slit	10 x 0.2 mm, macro
Partial scan	No
Lamp	Deuterium
Wavelength(s) 	254 nm
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Step status	Step was restored
Documentation step label	
Notes	

Spectrum Scan developed lempenge 1d - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):

Scanner type	Spectrum
Optimization for	Resolution
Measurement mode	Absorbance
Filter	n/a
Detector mode	Automatic
Spectrum speed	20 nm/s
Data resolution	1 nm
Slit	10 x 0.2 mm, macro
Lamp	Deuterium
Wavelength range	200 nm to 400 nm
Reference spectrum	Per lempenge, X=10.0 mm, Y=10.0 mm
Purity 	No
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Step status	Step was restored
Documentation step label	
Notes	

Substance kafein (R_F 0.160 +/- 0.010):

Track	R_F	X (mm)	Y (mm)
1	0.164	10.0	23.1
2	0.150	18.0	22.0
3	0.152	26.0	22.2
4	0.150	34.0	22.0
5	0.160	42.0	22.8
6	0.159	50.0	22.7
7	0.151	58.0	22.1
8	0.151	66.0	22.1
9	0.150	74.0	22.0

Scan developed lempenge 1e - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):

Scanner type	Single λ
Optimization for	Resolution
Measurement mode	Absorbance
Filter	n/a
Detector mode	Automatic
Scanning speed	20 mm/s
Data resolution	100 $\mu\text{m}/\text{step}$
Slit	10 x 0.2 mm, macro
Partial scan	No
Lamp	Deuterium
Wavelength(s)	275 nm
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Step status	⚠ Step was restored
Documentation step label	
Notes	

System suitability tests:

SST settings:

SST tracks

Data acquisition

Application 1 - Manual application:

Executed 30-Apr-2021 14:41:02 visionCATSuser

Development 1 - Chamber:

Executed 30-Apr-2021 14:41:05 visionCATSuser

Scan developed lempenge 1a - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):

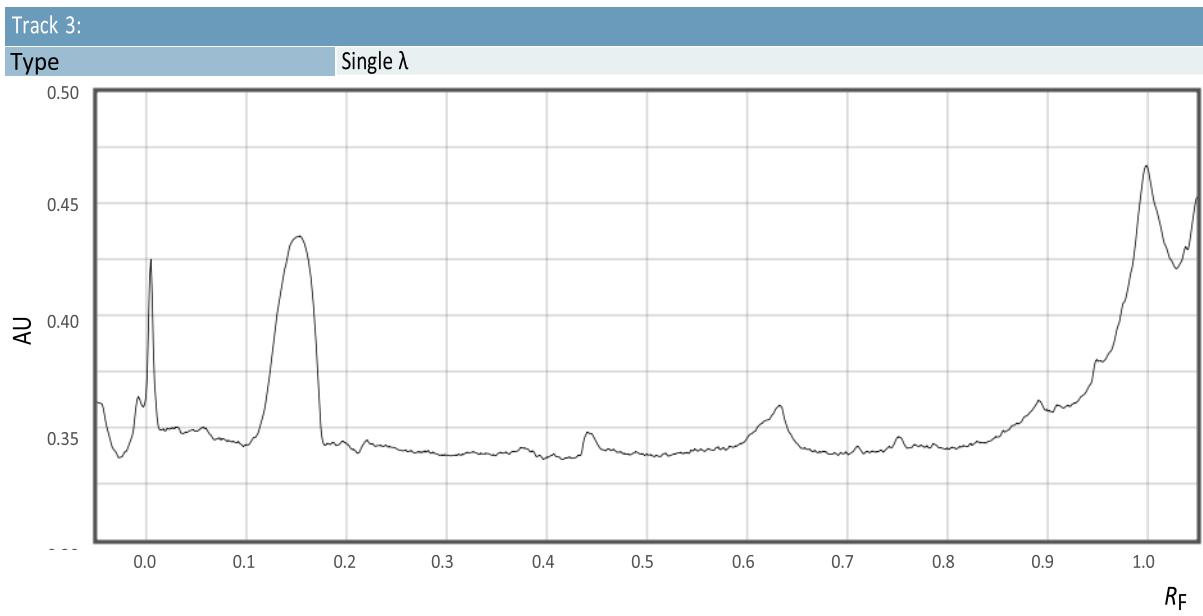
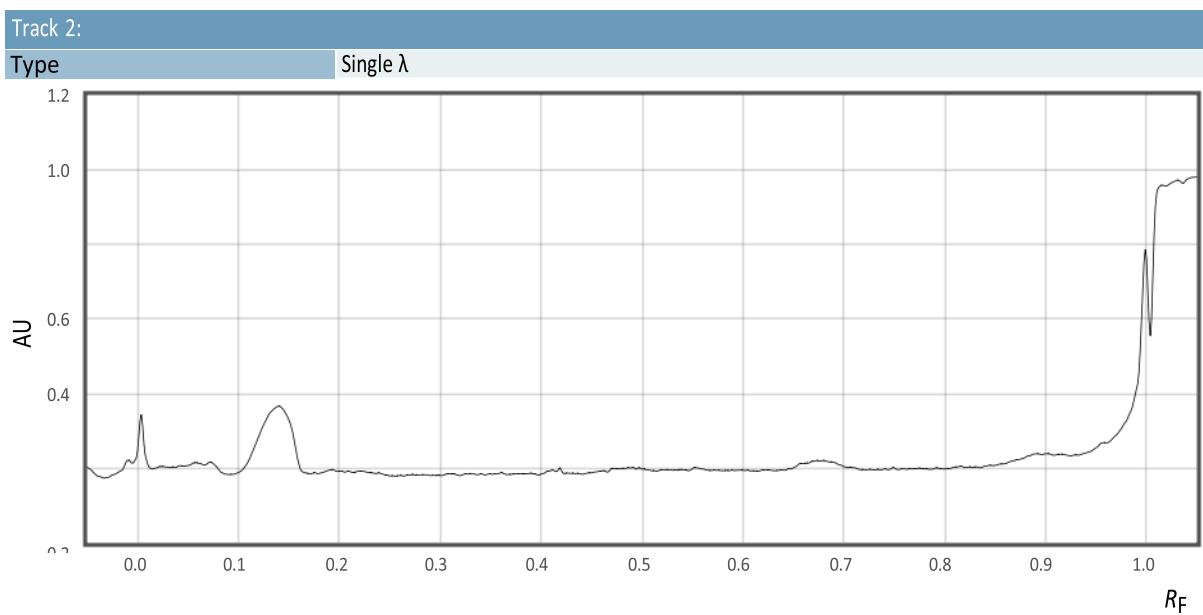
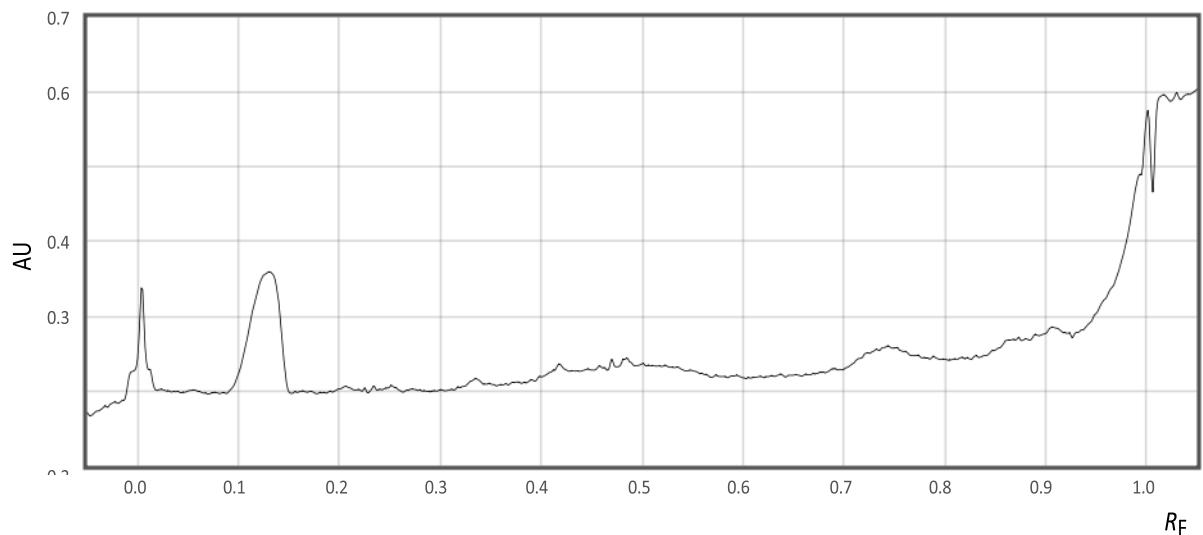
Executed 30-Apr-2021 14:41:07 visionCATSuser

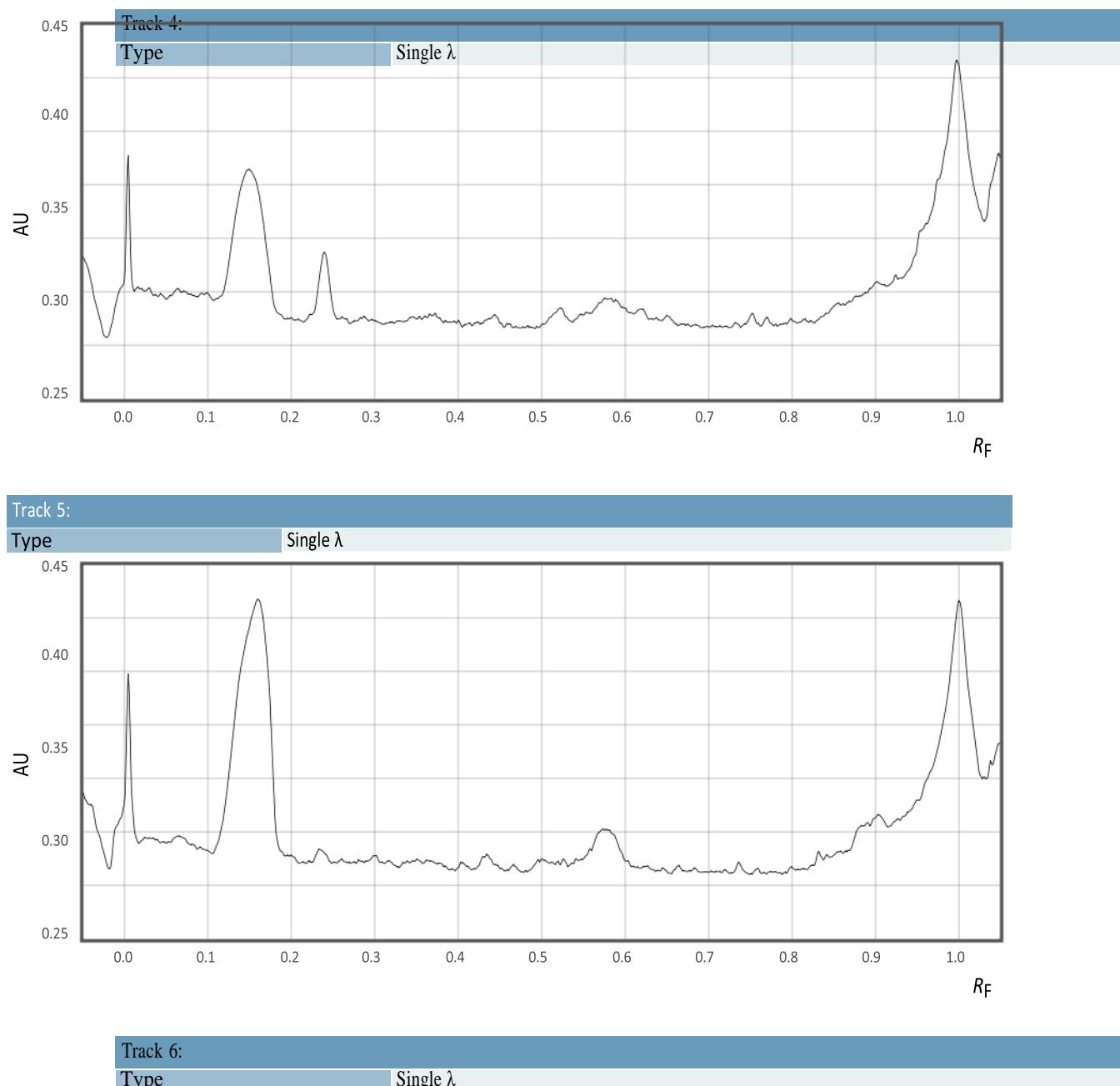
Scan:

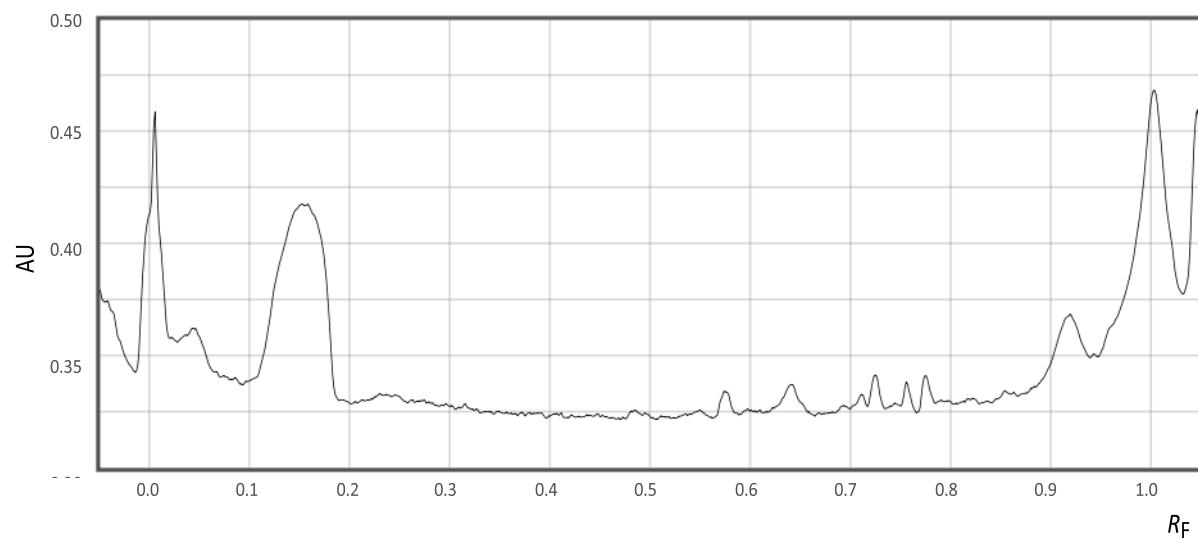
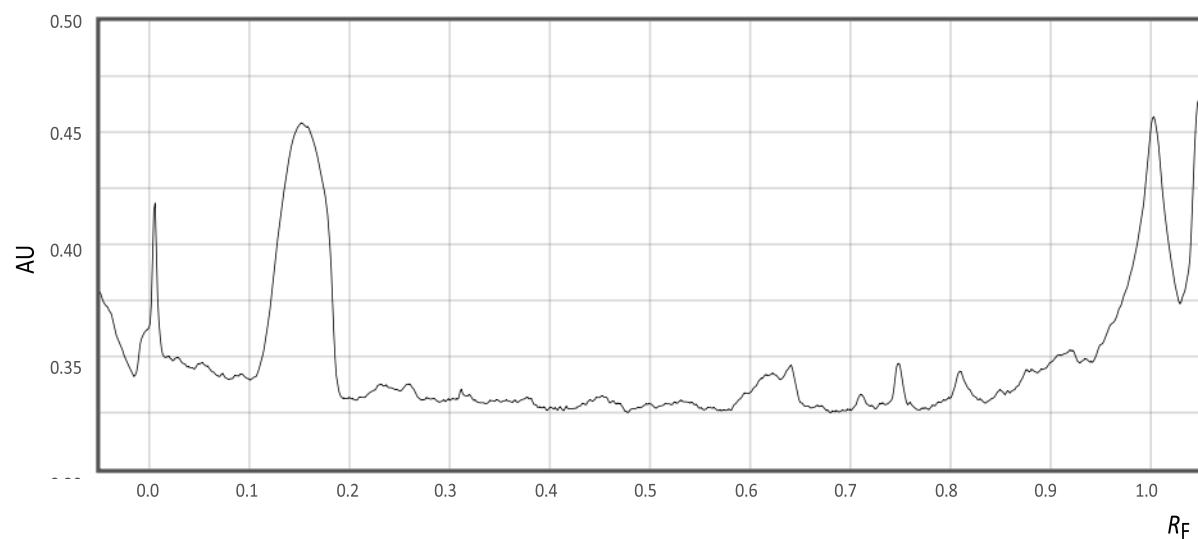
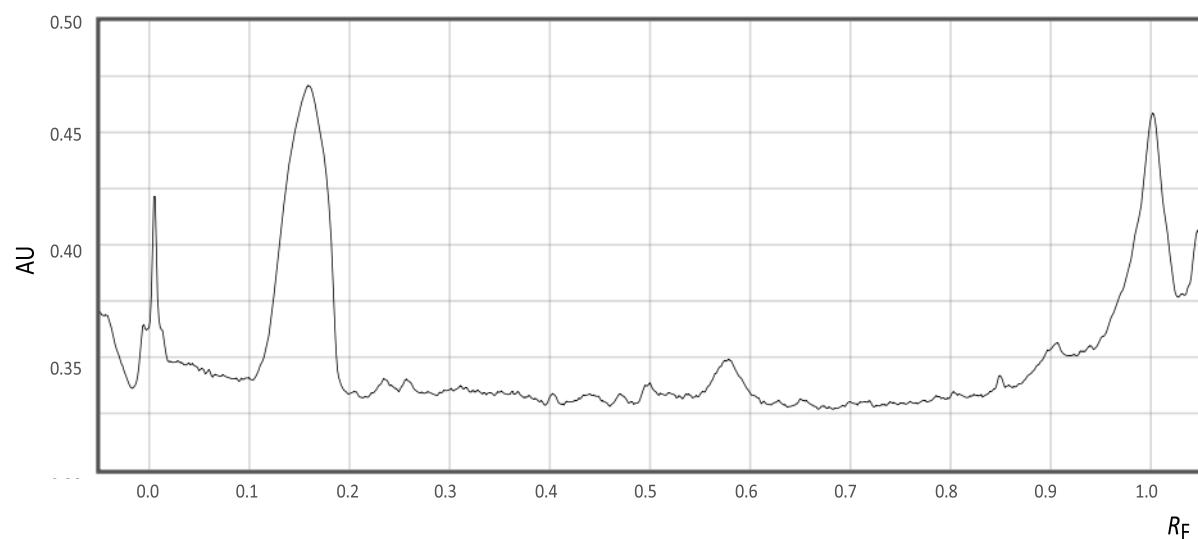
Wavelength 254 nm

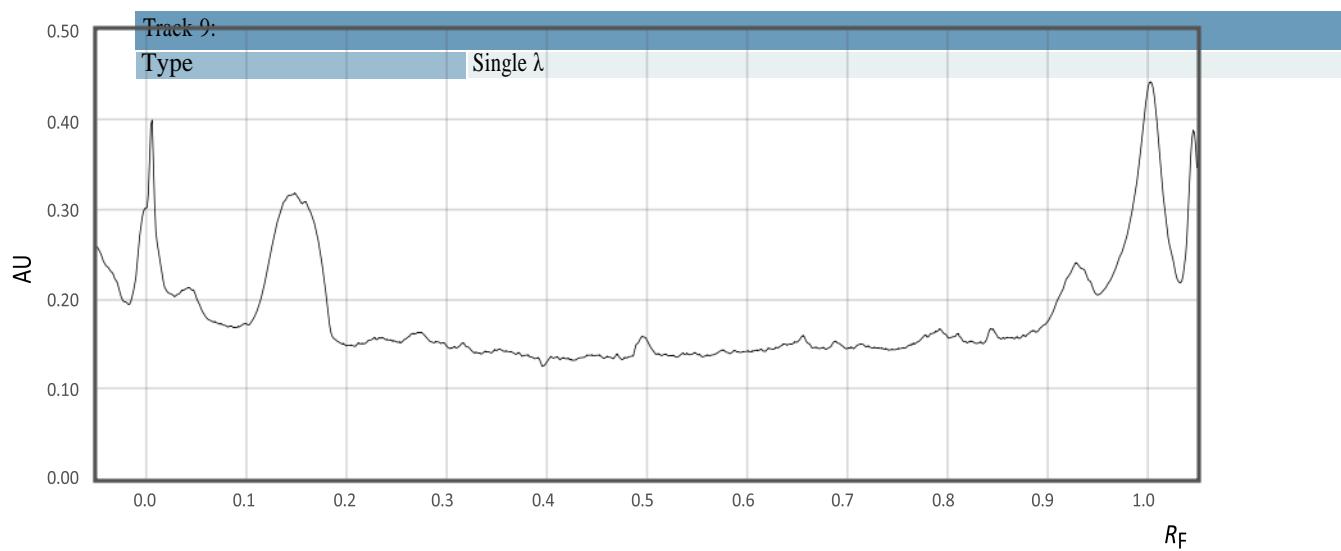
Track 1:

Type Single λ



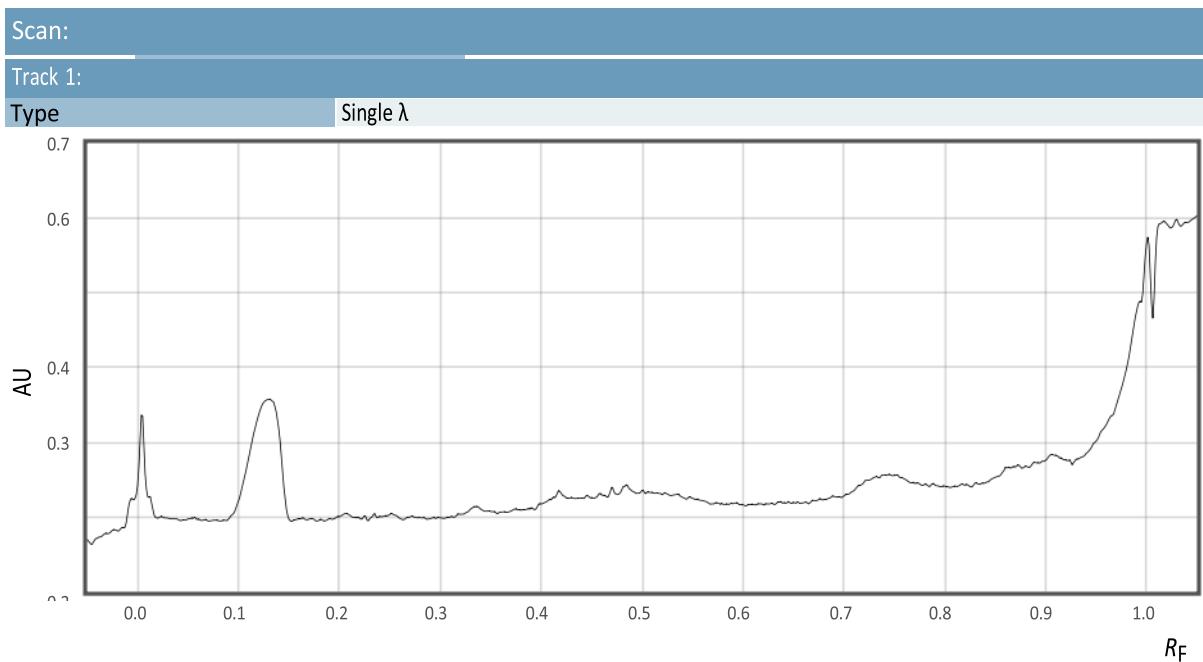






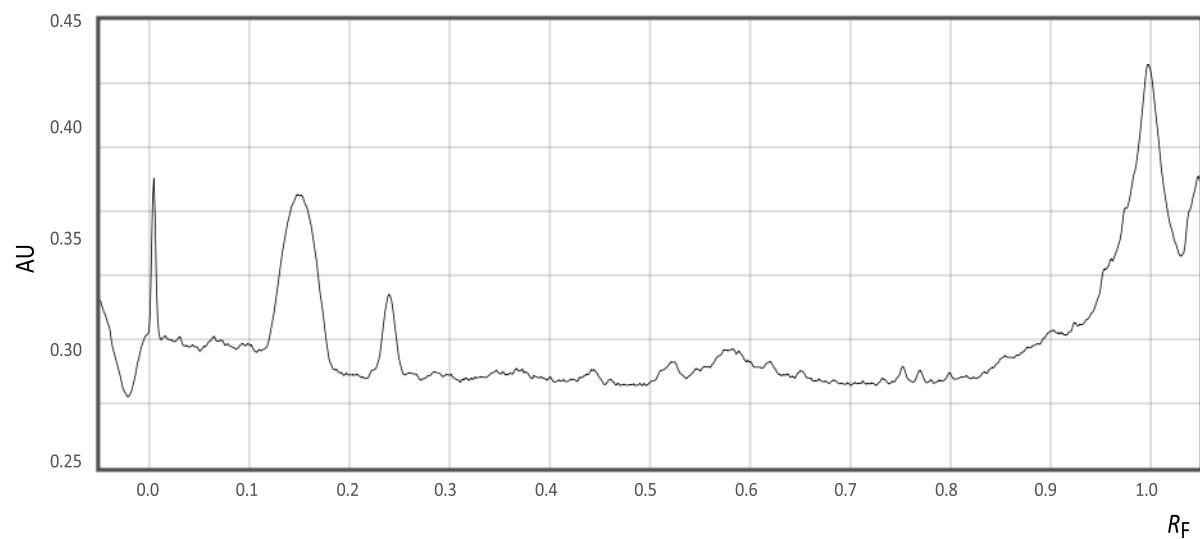
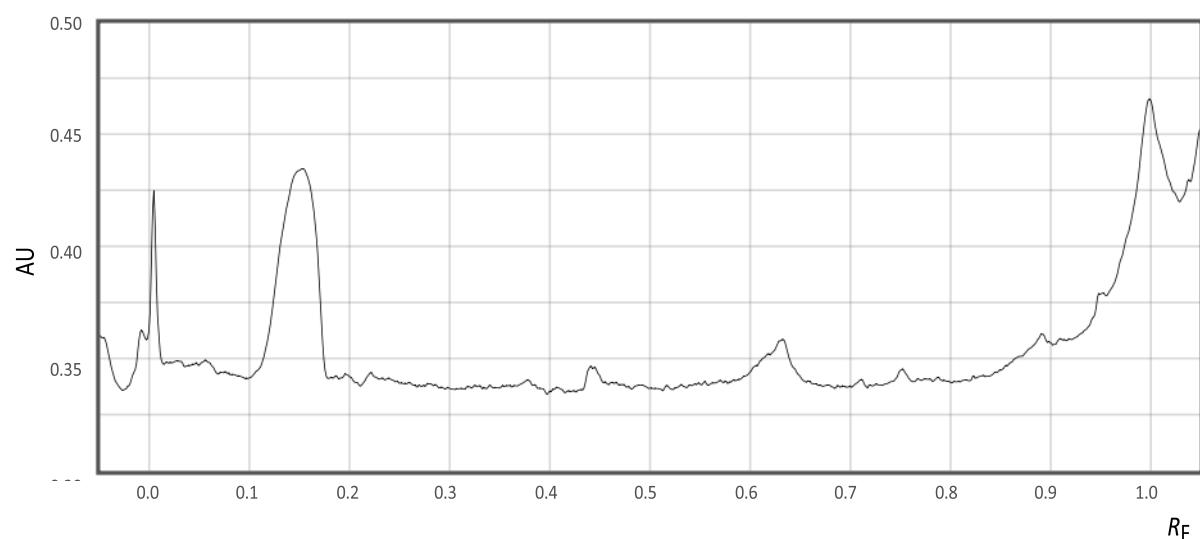
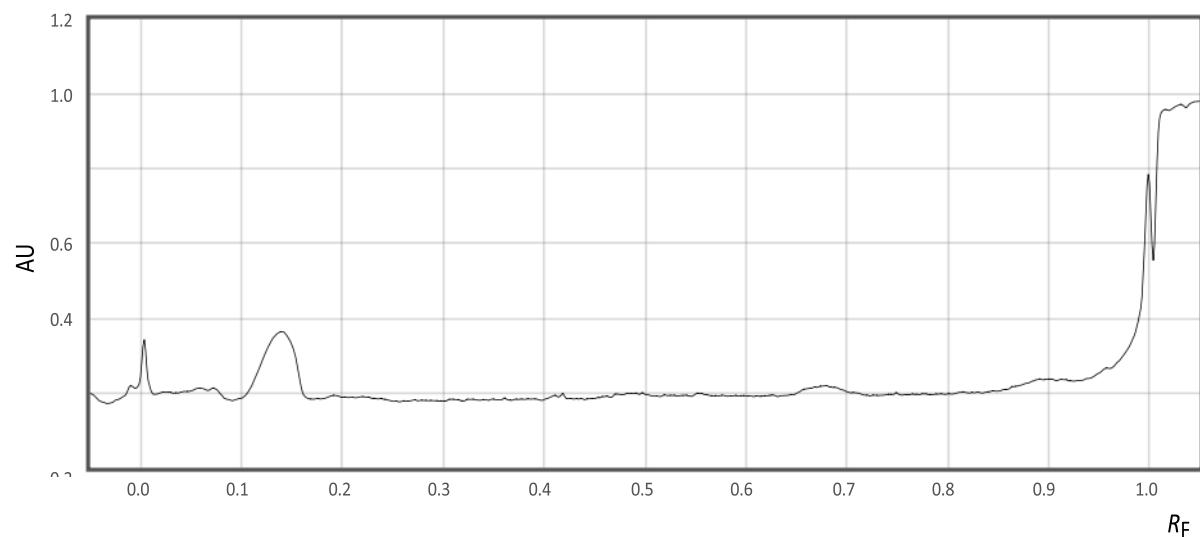
Scan developed plate 1b - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):

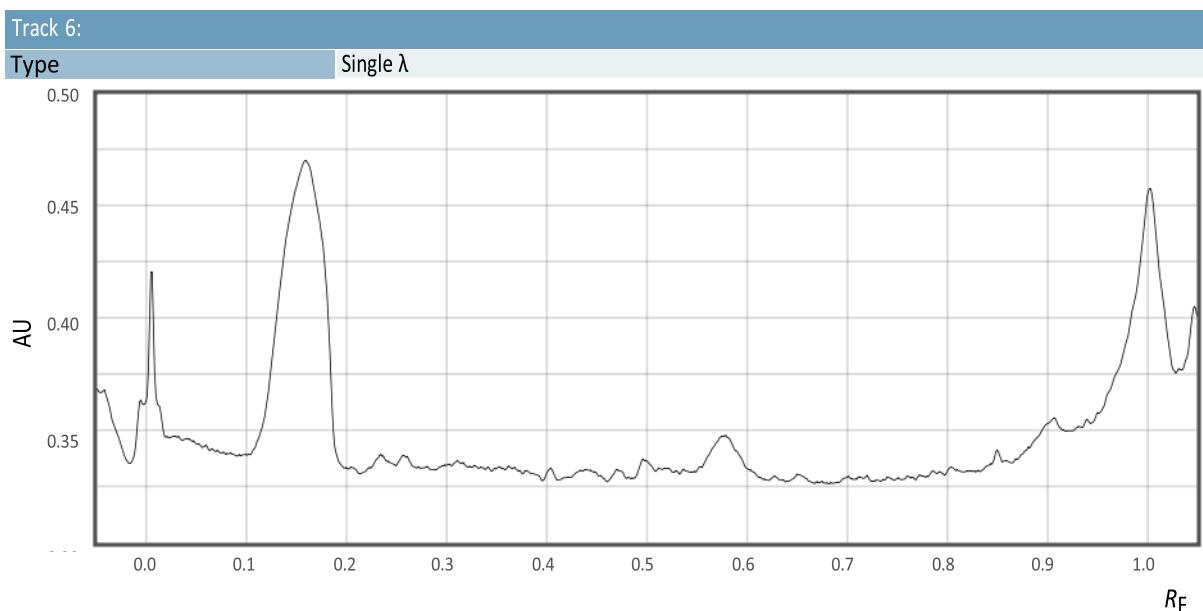
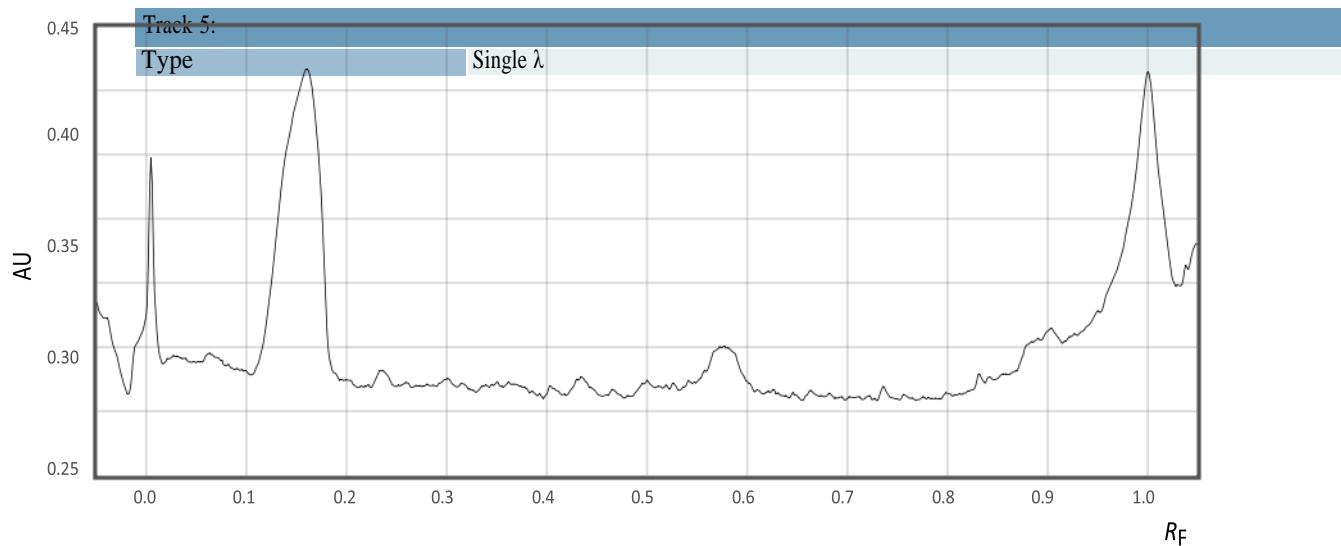
Executed
30-Apr-2021 14:43:15 visionCATSuser



Track 2:

Type Single λ

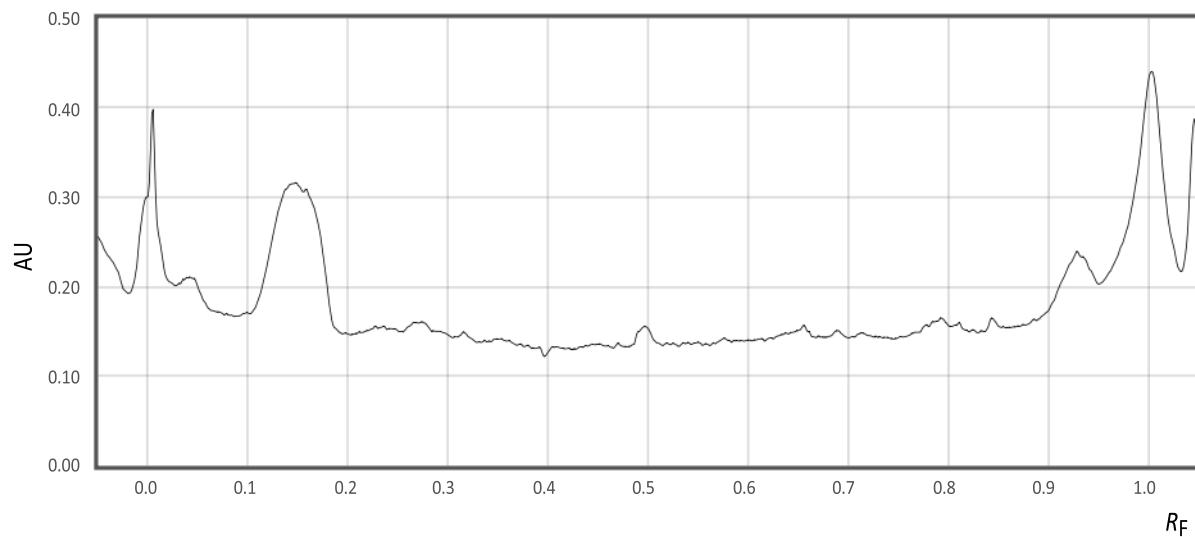
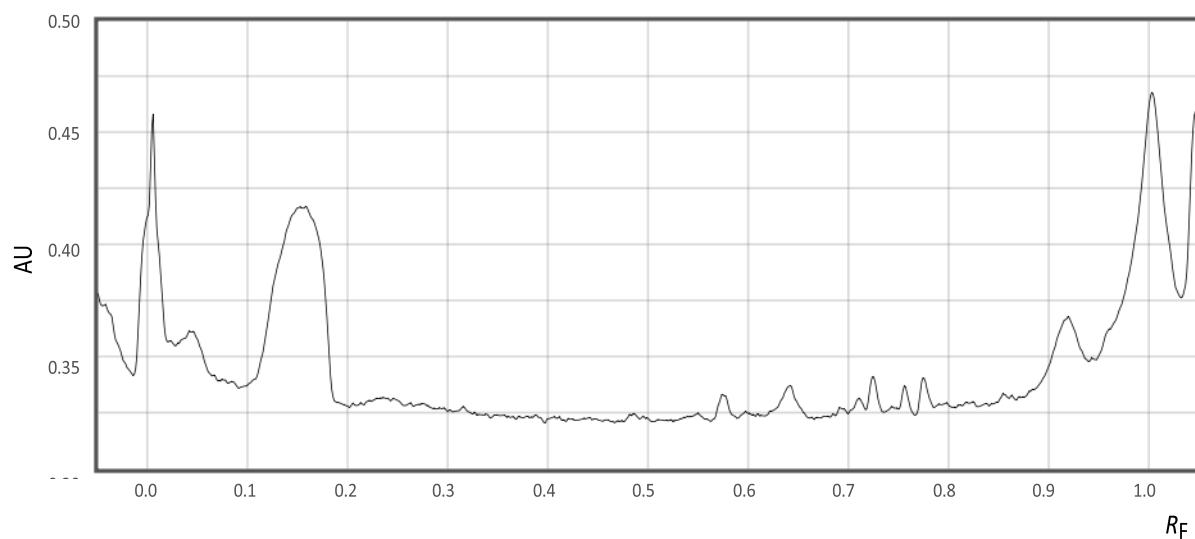
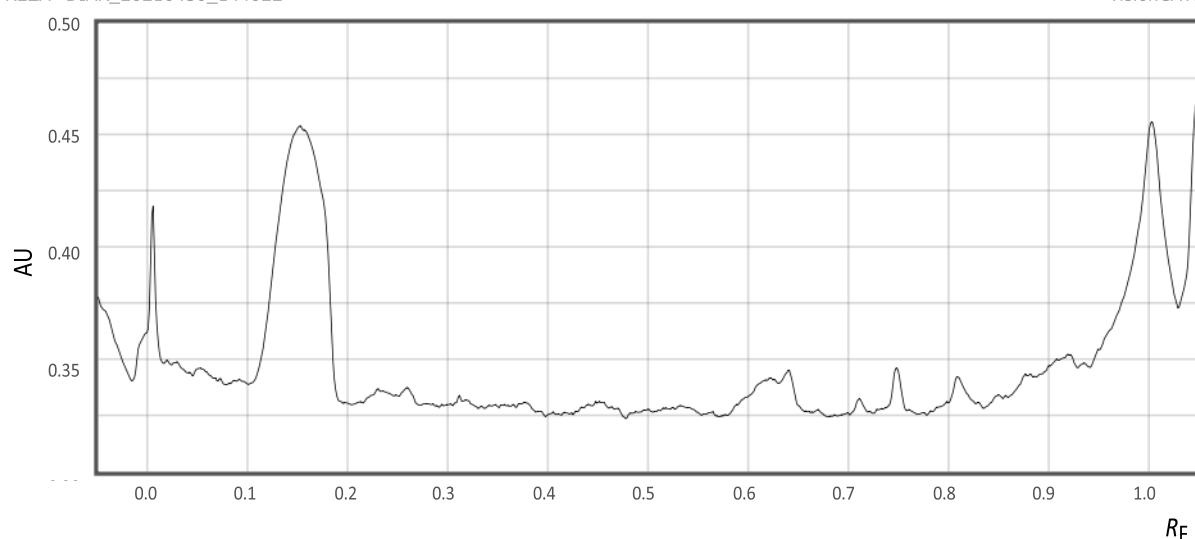




Track 7:
Type Single λ

REZA DIAR_20210430_144022

visionCATS

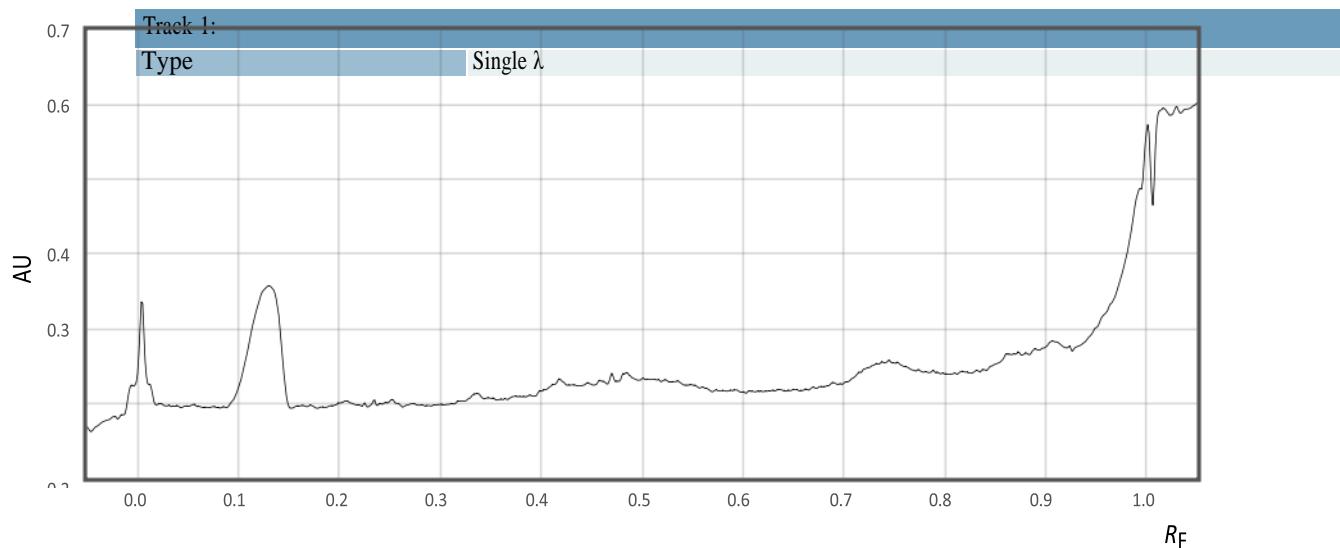
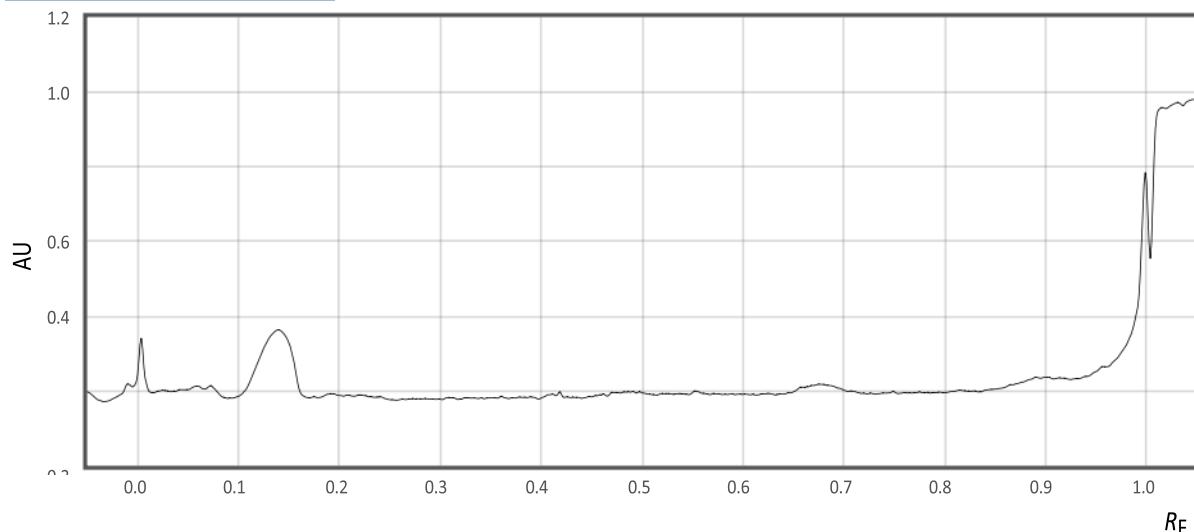


Scan developed lempenge 1c - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):

Executed 30-Apr-2021 14:45:04 visionCATSuser

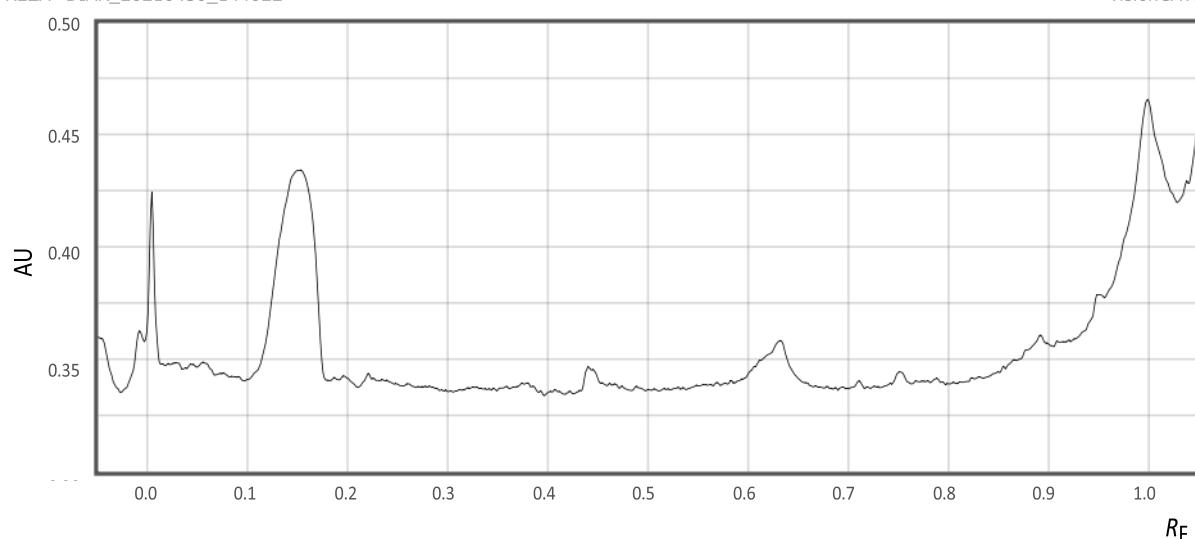
Scan:

Wavelength 254 nm

**Track 2:**Type Single λ **Track 3:**Type Single λ

REZA DIAR_20210430_144022

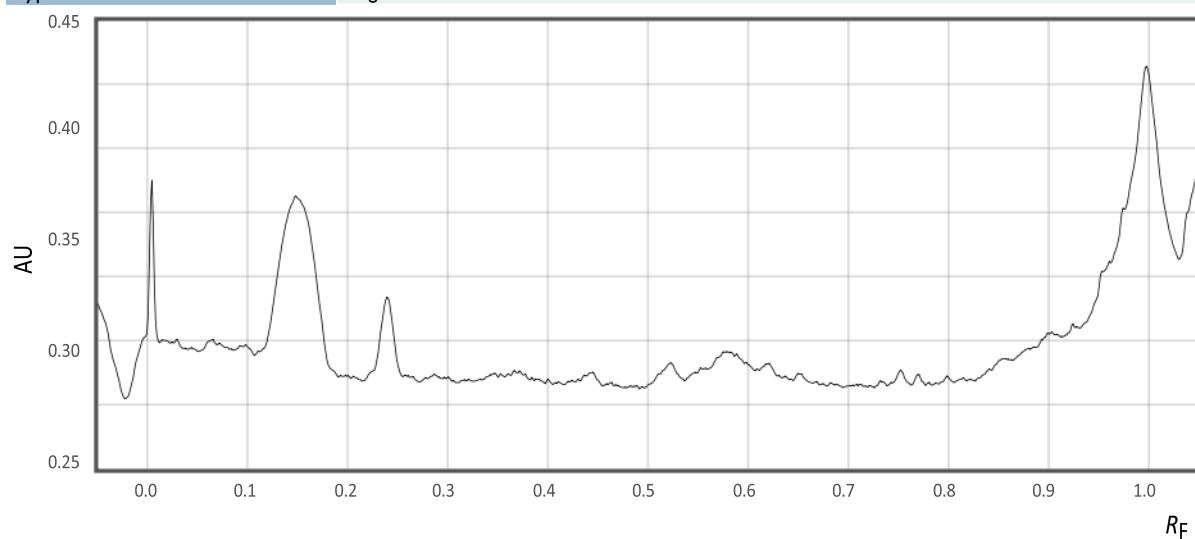
visionCATS



Track 4:

Type

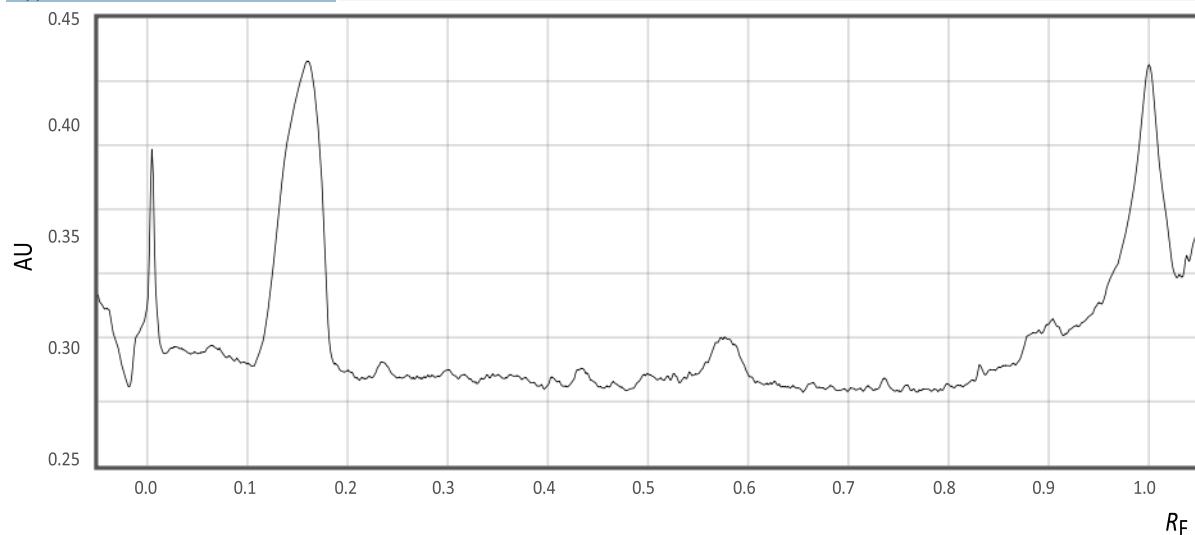
Single λ

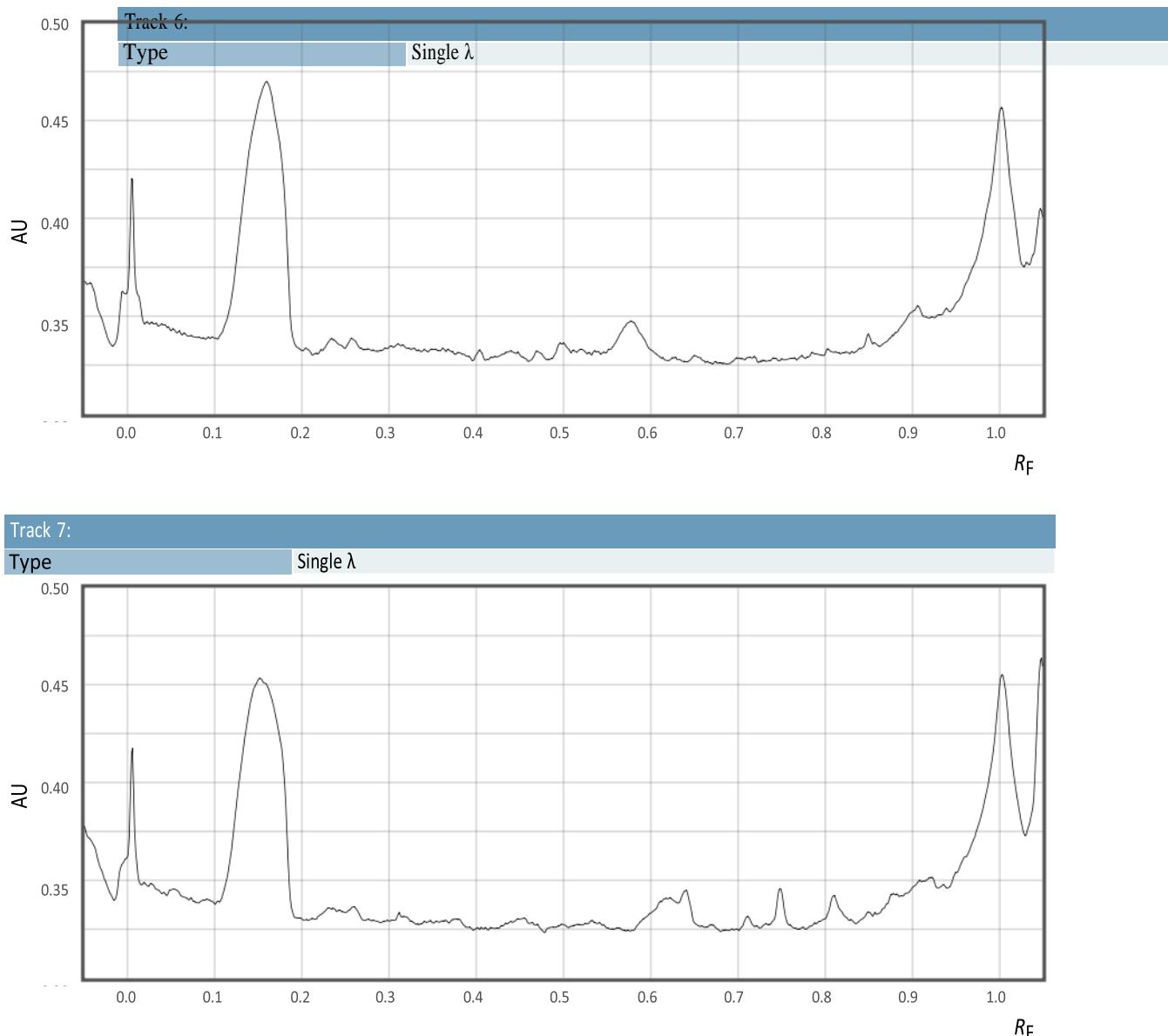


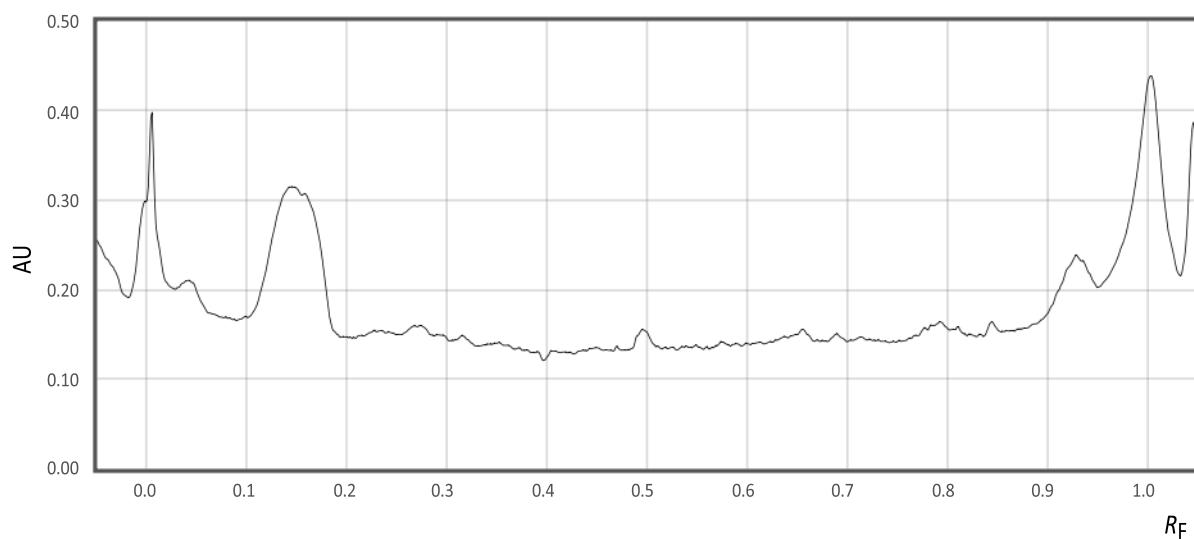
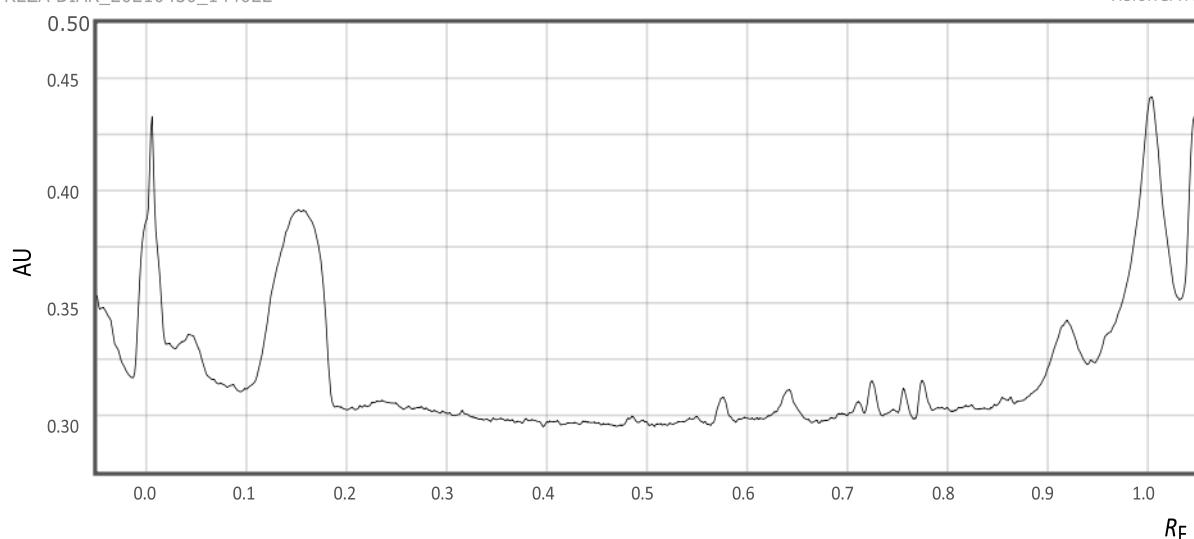
Track 5:

Type

Single λ





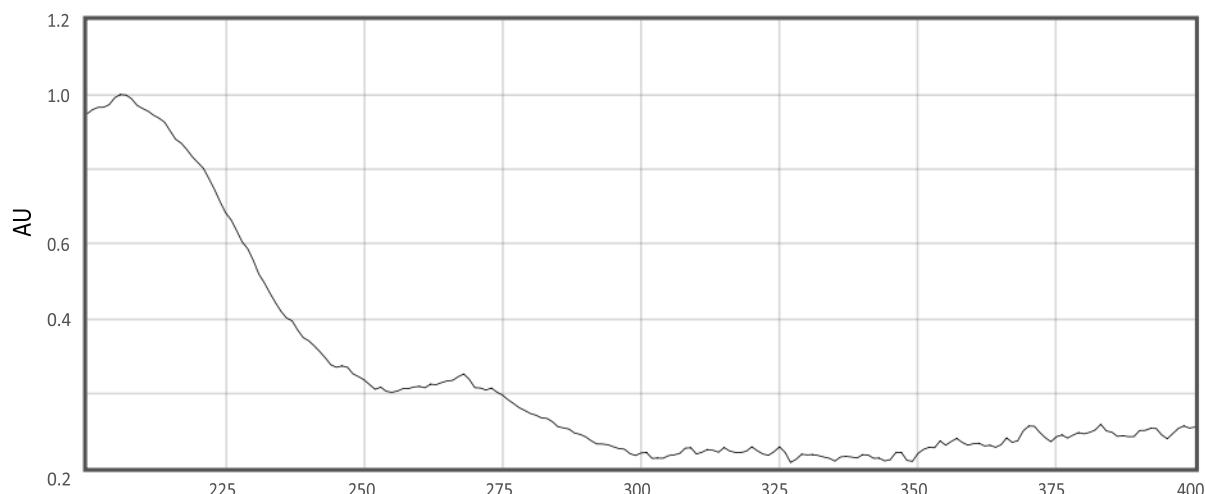
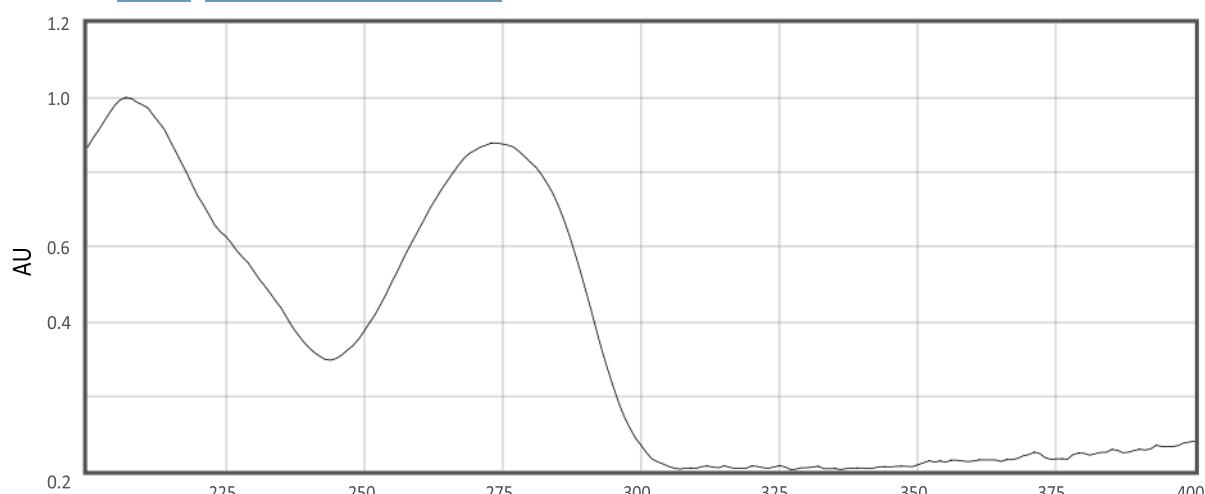
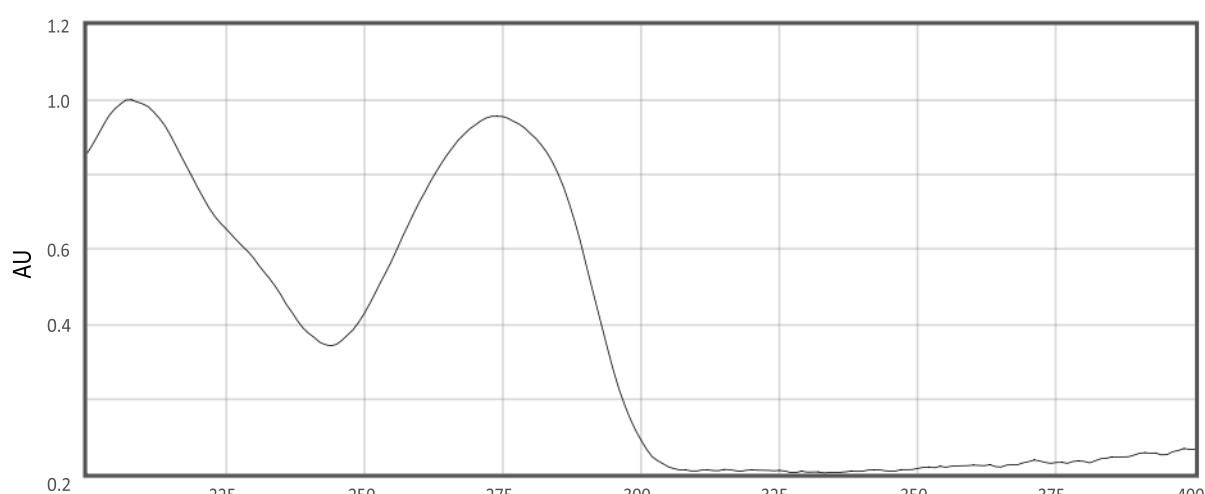
**Spectrum Scan developed lempenge 1d - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):**

Executed

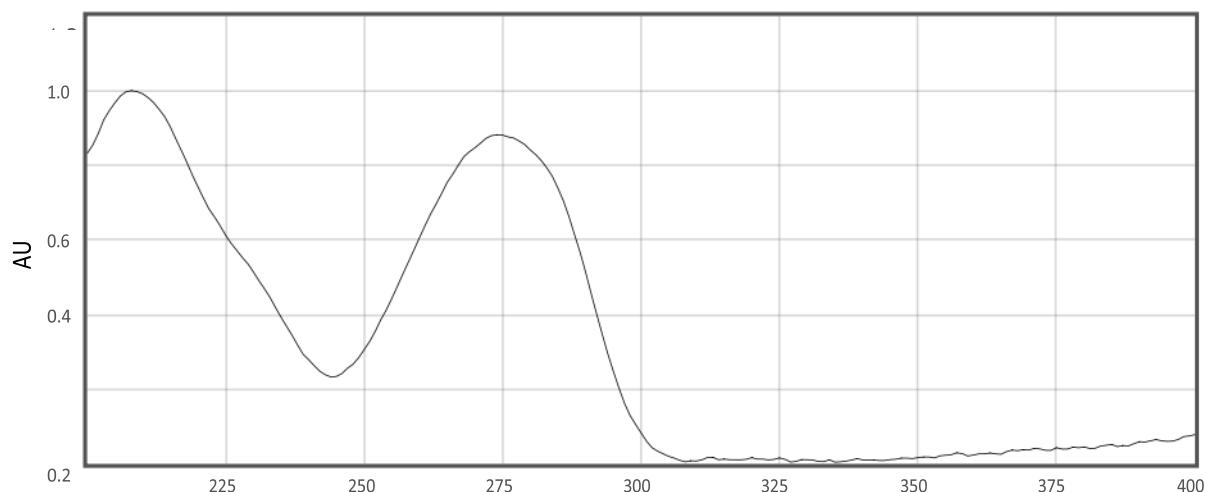
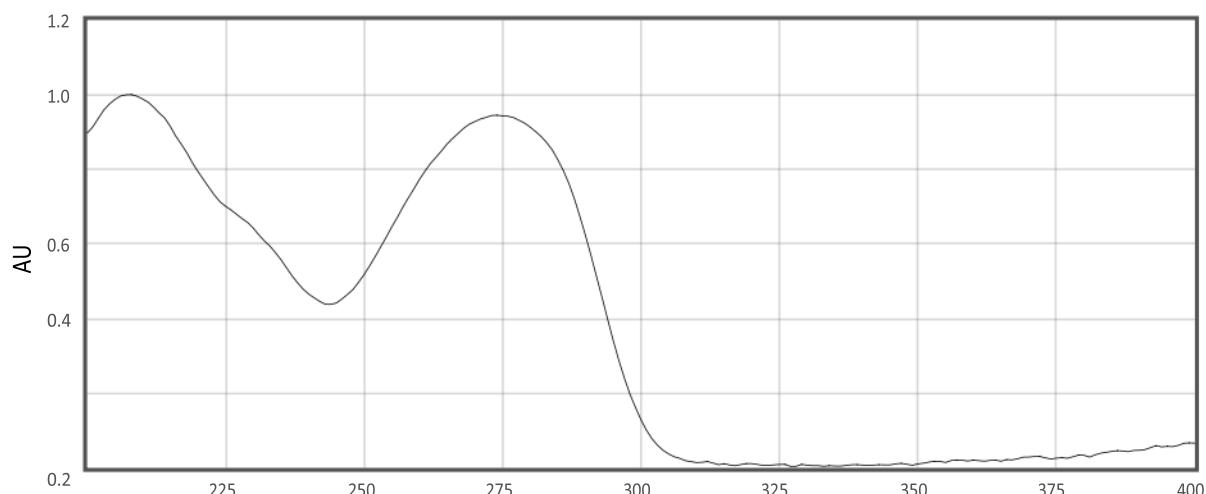
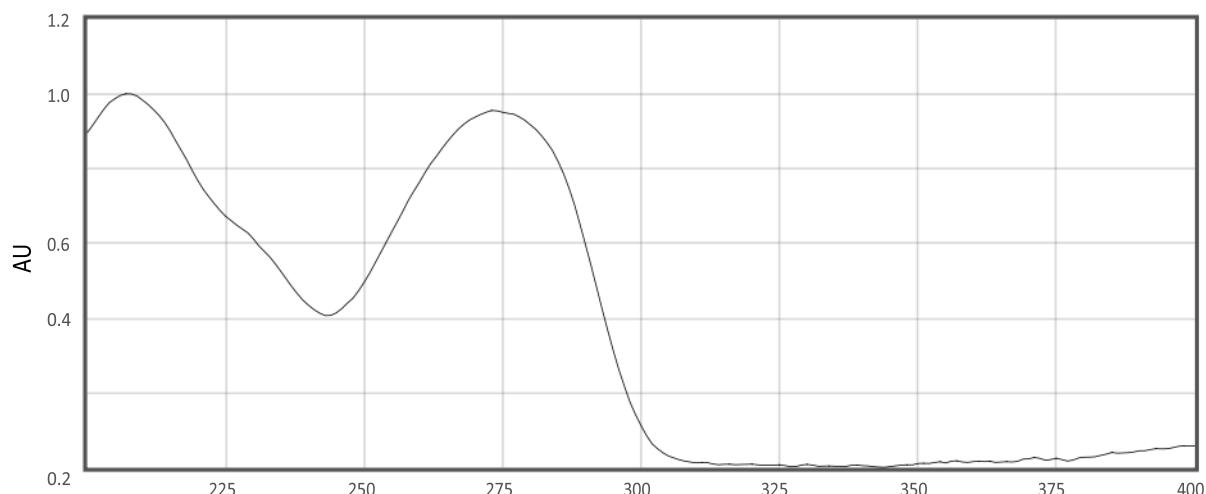
30-Apr-2021 14:50:19 visionCATSuser

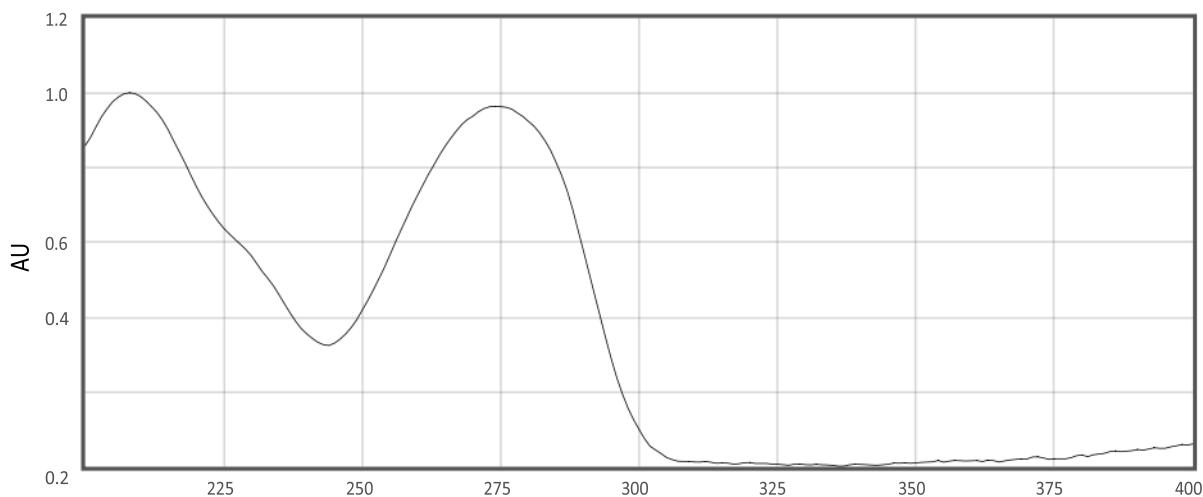
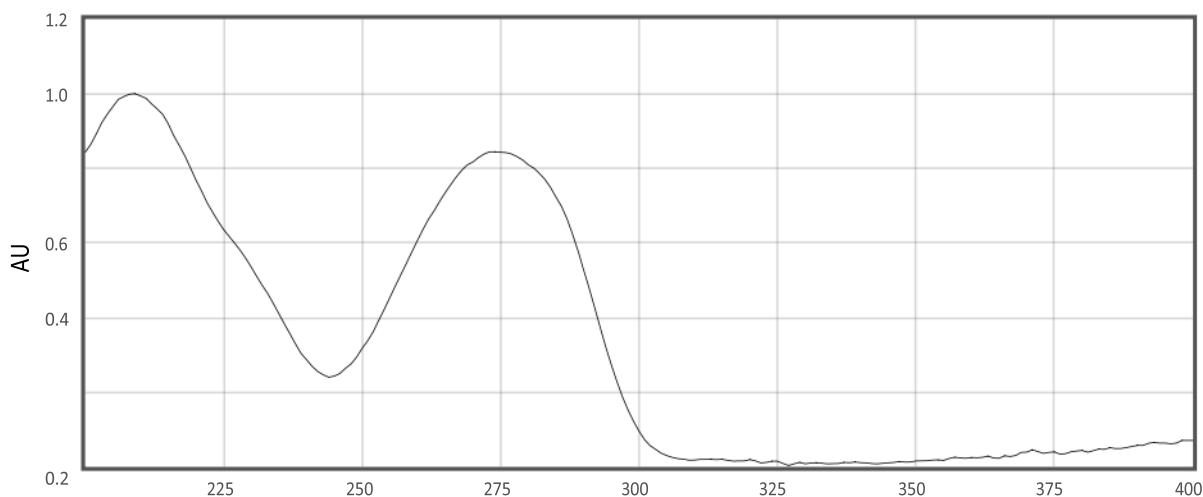
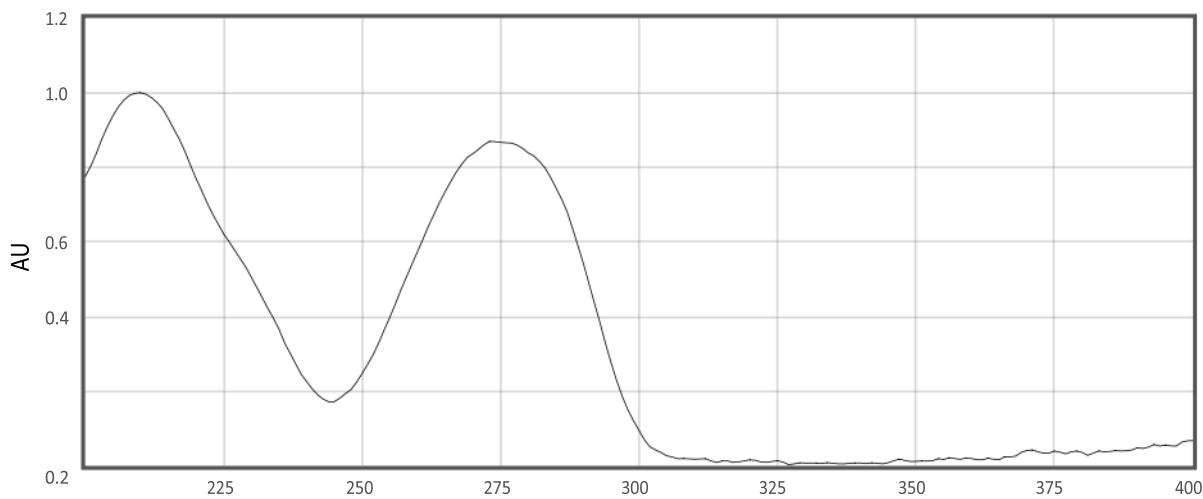
Substance kafein (R_F 0.160 +/- 0.010):

Tr. 1 P. 0.160 (10.0 mm 22.1 mm)

Tr. 2 R_F 0.150 (18.0 mm, 22.0 mm)Tr. 3 R_F 0.152 (26.0 mm, 22.2 mm)

REZA DIAR_20210430_144022

Tr. 4 R_F 0.94 (34.0 mm, 22.0 mm)Tr. 5 R_F 0.160 (42.0 mm, 22.8 mm)Tr. 6 R_F 0.159 (50.0 mm, 22.7 mm)

Tr. 7 R_F 0.151 (58.0 mm, 22.1 mm)Tr. 8 R_F 0.151 (66.0 mm, 22.1 mm)Tr. 9 R_F 0.150 (74.0 mm, 22.0 mm)

Spectrum correlation data:

Substance name	Track	R_F	r(s,m)	r(e,m)	Ref. spectrum	Correlation
kafein	1	0.164	0.000000	0.000000		0.000000
kafein	2	0.150	0.000000	0.000000		0.000000
kafein	3	0.152	0.000000	0.000000		0.000000
kafein	4	0.150	0.000000	0.000000		0.000000
kafein	5	0.160	0.000000	0.000000		0.000000
kafein	6	0.159	0.000000	0.000000		0.000000
kafein	7	0.151	0.000000	0.000000	Tr. 6, Rf 0.159, Sub. kafein	0.997724
kafein	8	0.151	0.000000	0.000000	Tr. 9, Rf 0.150, Sub. kafein	0.997604
kafein	9	0.150	0.000000	0.000000	Tr. 8, Rf 0.151, Sub. kafein	0.997604

Scan developed lempenye 1e - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):

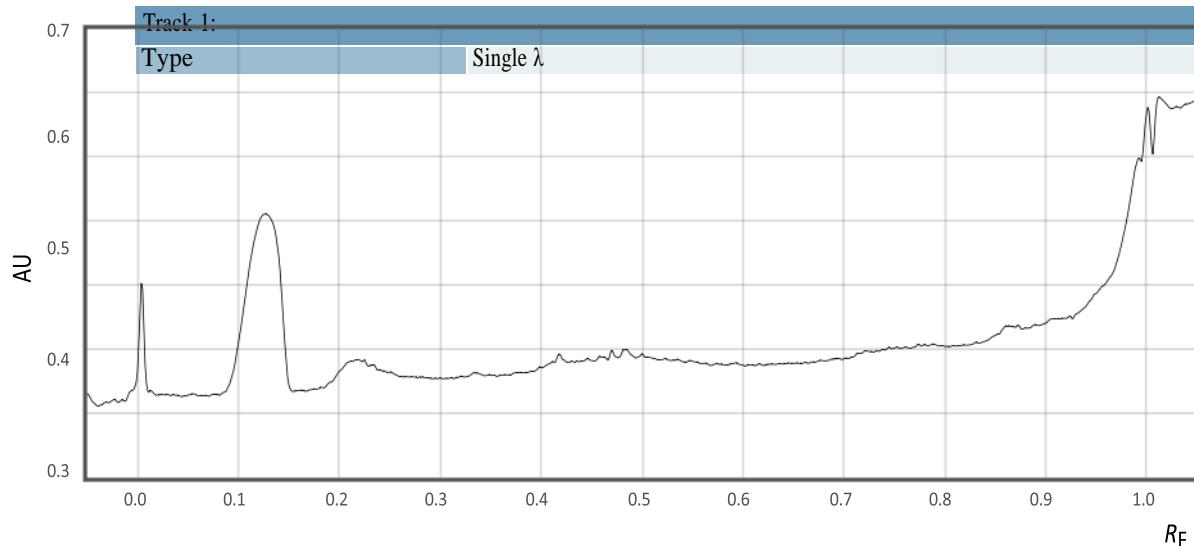
Executed

30-Apr-2021 14:54:05 visionCATSuser

Scan:

Wavelength

275 nm

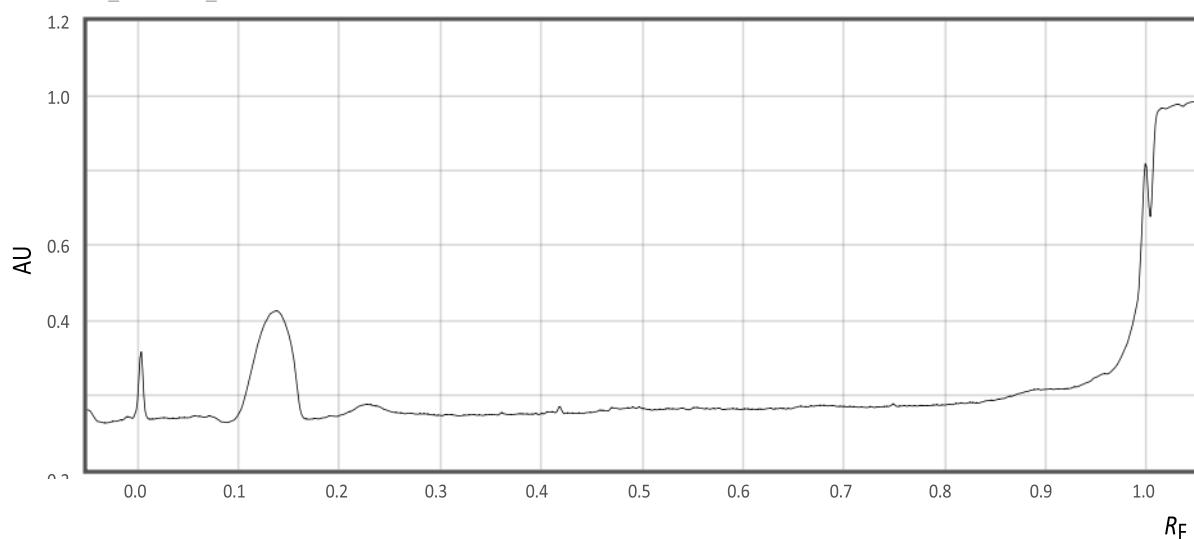

Track 2:

Type

 Single λ

REZA DIAR_20210430_144022

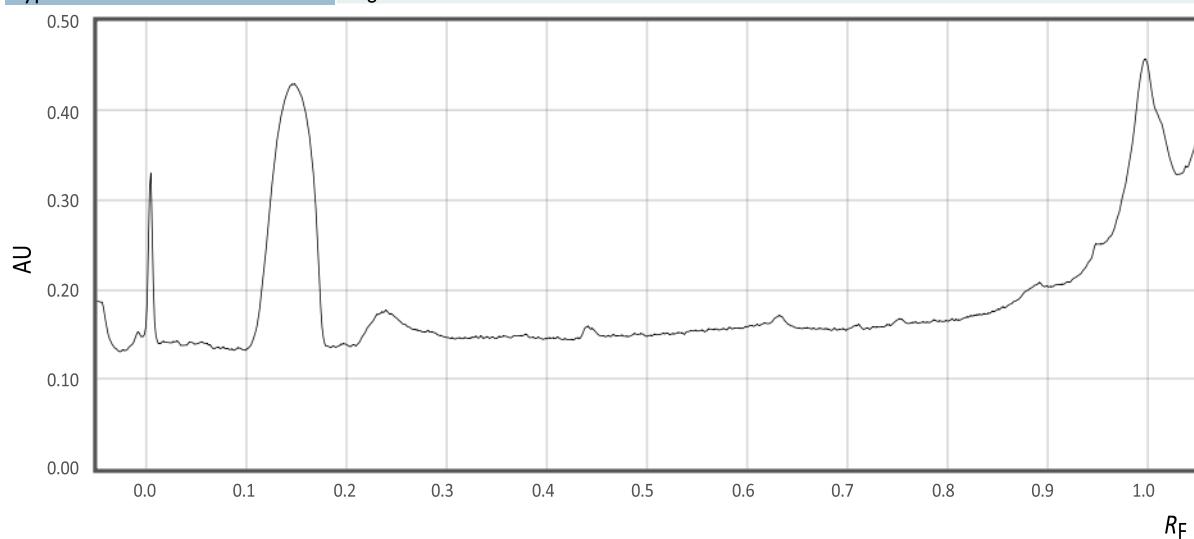
visionCATS



Track 3:

Type

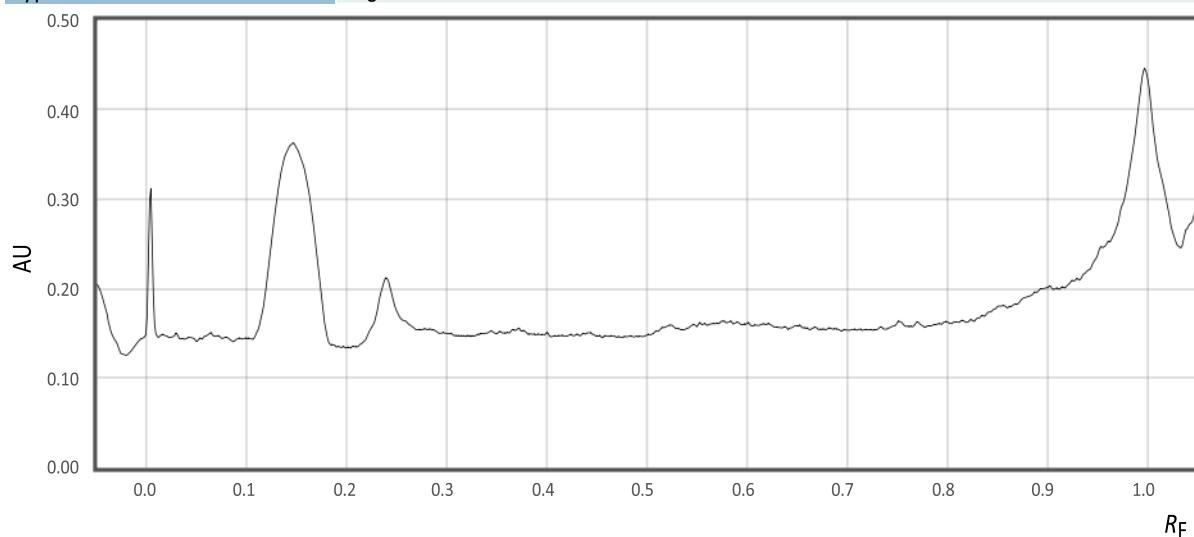
Single λ

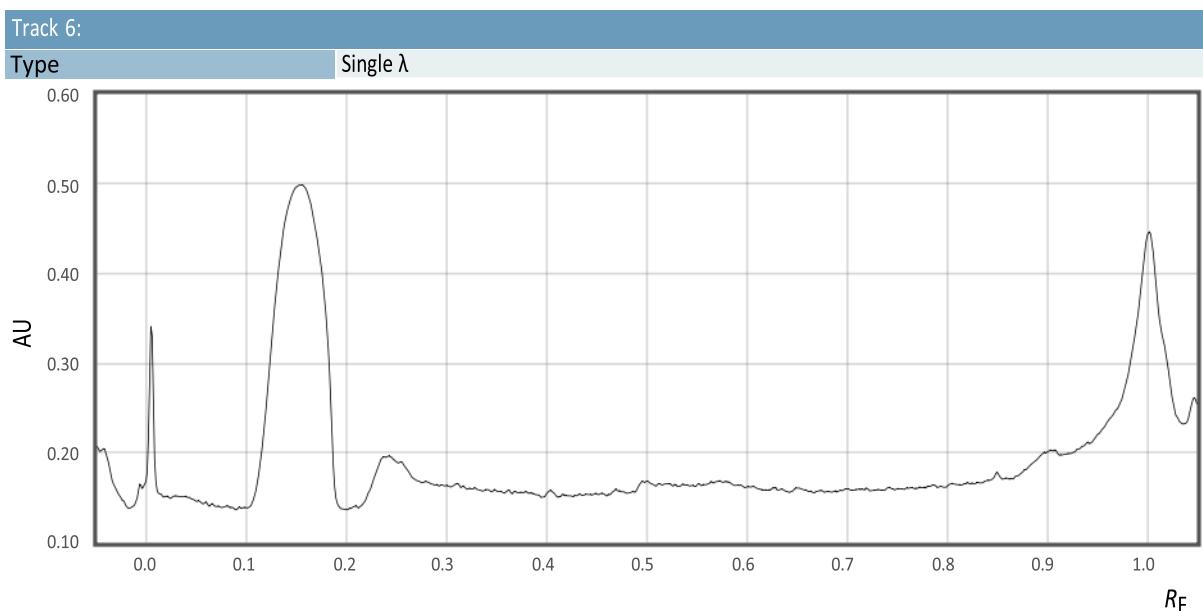
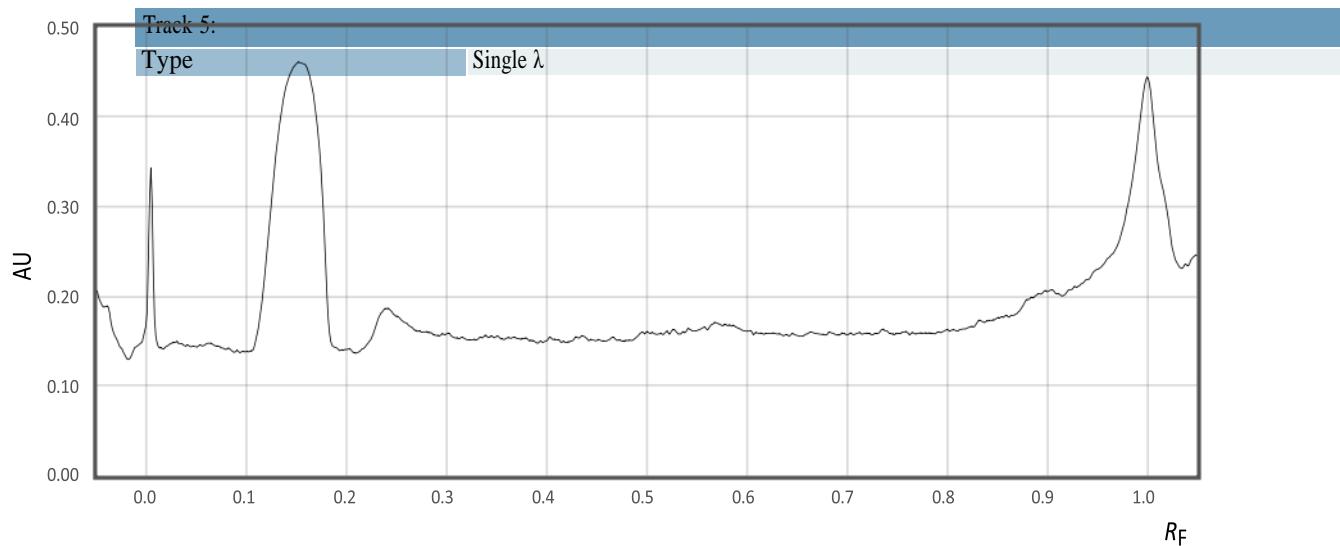


Track 4:

Type

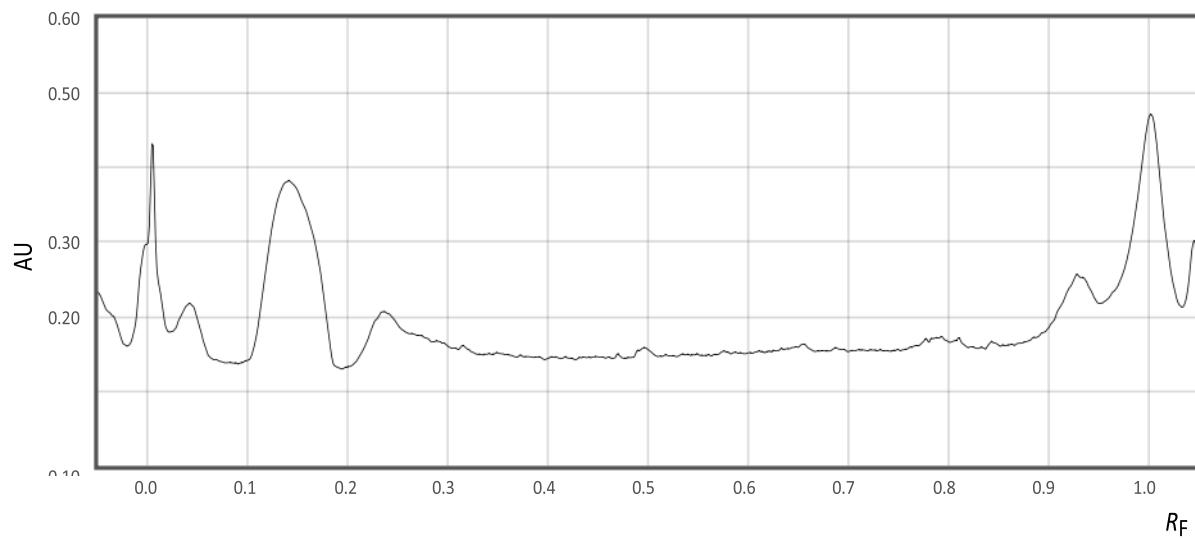
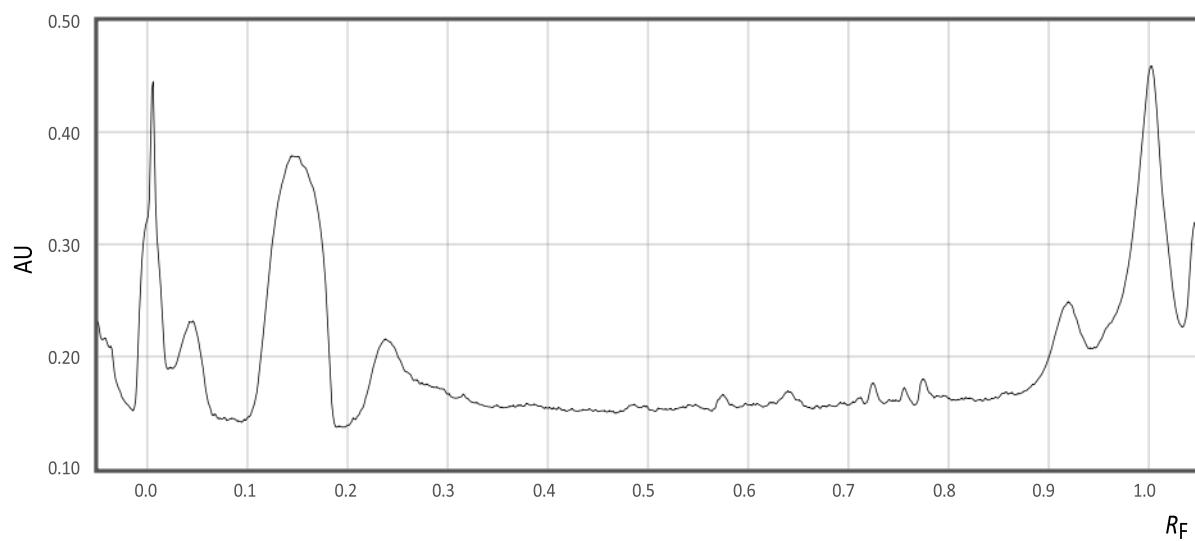
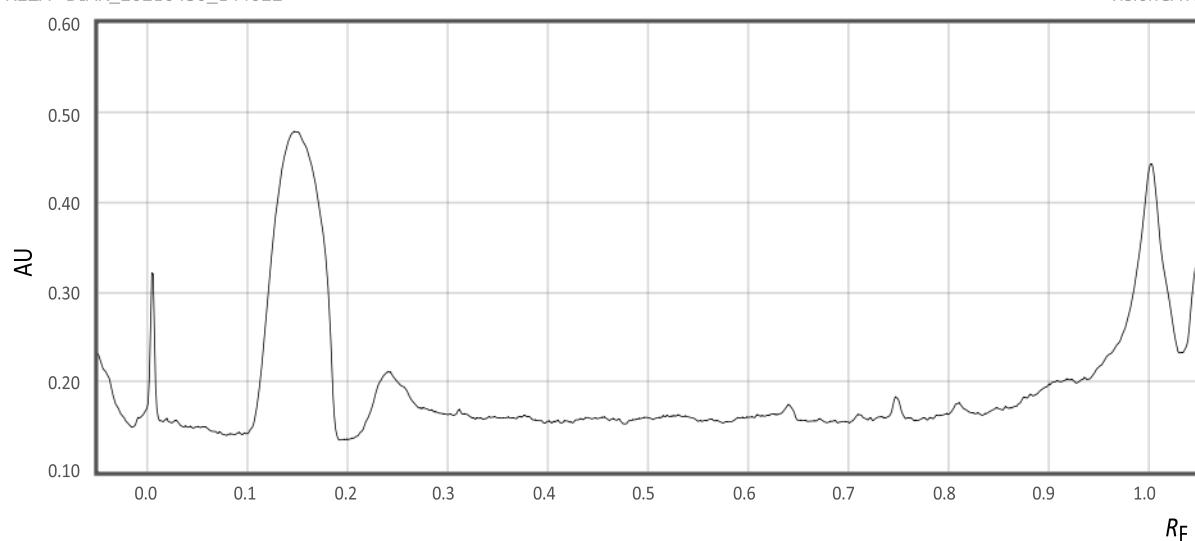
Single λ





Track 7:

Type Single λ



Evaluation 1 :

Locked	No
Step	Scan developed lempenge 1c
Concentration unit type	Mass / volume
Notes	

Definition:**References:****S1**

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	400.000 µg/ml	100.00 %

S2

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	600.000 µg/ml	100.00 %

S3

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	800.000 µg/ml	100.00 %

S4

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	1.000 µg/ml	100.00 %

S5

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	1.200 µg/ml	100.00 %

S6

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	1.400 µg/ml	100.00 %

Samples:

Vial ID	Amount	Volume solution	Reference amount	Related to
SP 1	768.000 mg	0.00 ml	0.000 mg	
SP 2	792.000 mg	0.00 ml	0.000 mg	
SP 3	812.000 mg	0.00 ml	0.000 mg	

Integration parameters:

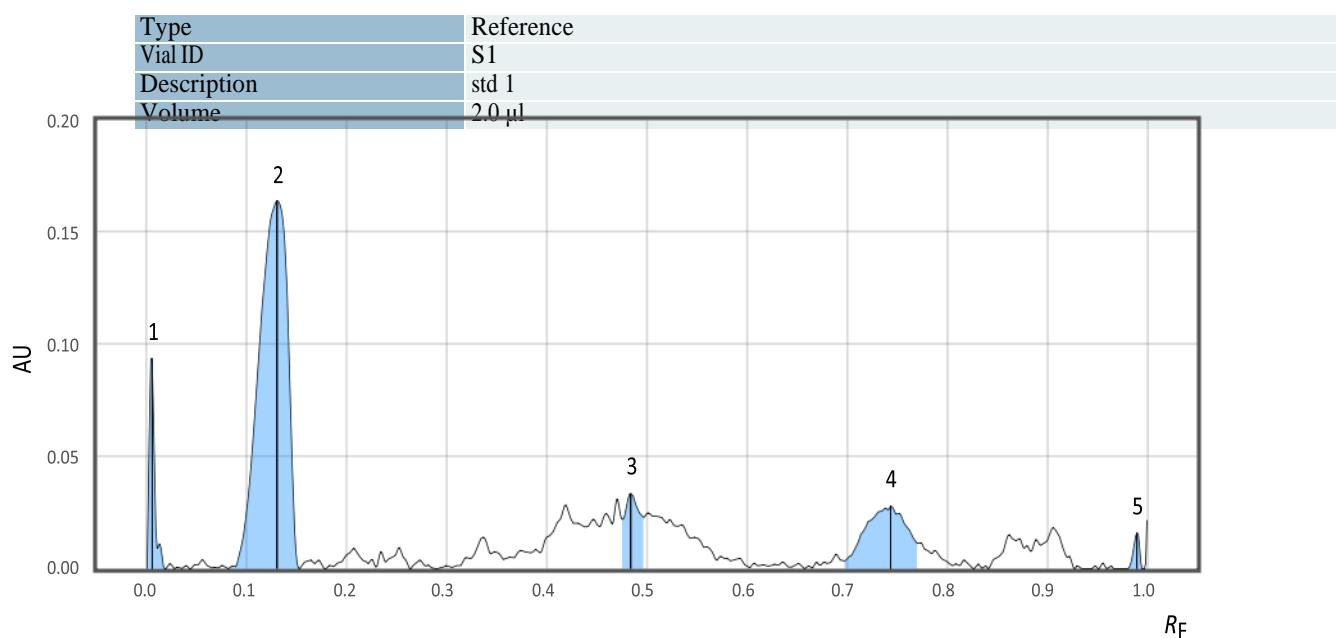
Bounds	[0.000,1.000]
Smoothing	Savitzky-Golay of order 3 and window 7
Baseline correction	Lowest slope with noise 0.05
Profile subtraction	None
Peaks detection	Gauss (legacy) with sensitivity 0.1, separation 1 and threshold 0.1

Scan:

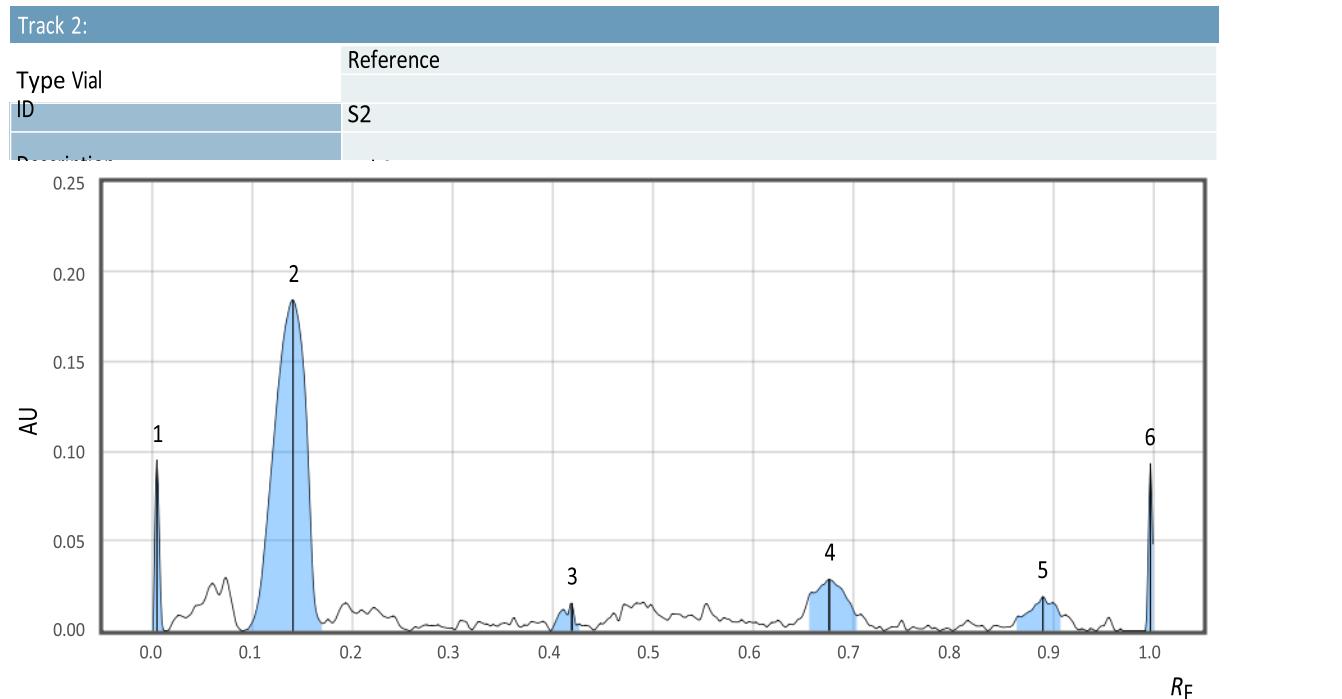
Wavelength 254 nm

Track 1:

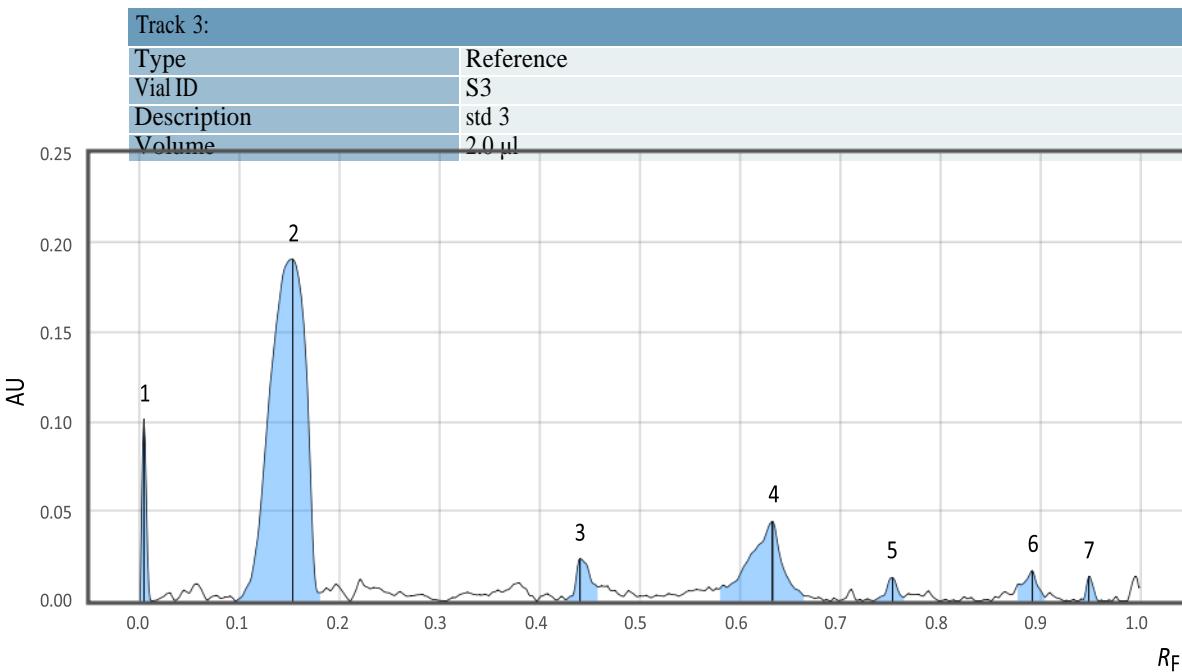
REZA DIAR_20210430_144022



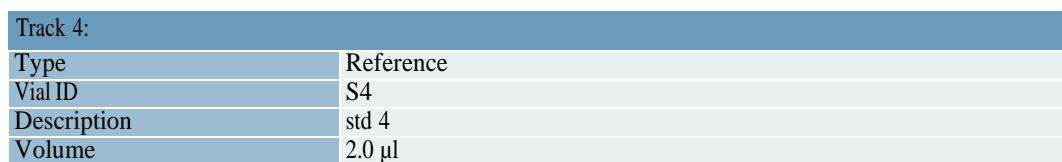
Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R_F	H	R_F	H	%	R_F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.005	0.0936	27.93	0.018	0.0000	0.00058	7.13	No	
2	0.081	0.0000	0.130	0.1640	48.98	0.152	0.0000	0.00545	67.39	No	kafein
3	0.475	0.0220	0.484	0.0335	10.00	0.496	0.0230	0.00059	7.27	No	
4	0.698	0.0035	0.744	0.0279	8.32	0.771	0.0113	0.00137	16.89	No	
5	0.980	0.0000	0.990	0.0160	4.77	0.995	0.0000	0.00011	1.33	No	



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.004	0.0949	21.82	0.011	0.0000	0.00047	4.96	No	
2	0.090	0.0000	0.140	0.1843	42.36	0.169	0.0040	0.00673	70.87	No	kafein
3	0.398	0.0000	0.419	0.0153	3.52	0.429	0.0028	0.00024	2.49	No	
4	0.654	0.0152	0.676	0.0284	6.54	0.704	0.0084	0.00108	11.42	No	
5	0.861	0.0044	0.890	0.0190	4.36	0.909	0.0079	0.00059	6.20	No	
6	0.993	0.0000	0.998	0.0931	21.41	1.000	0.0482	0.00038	4.05	No	

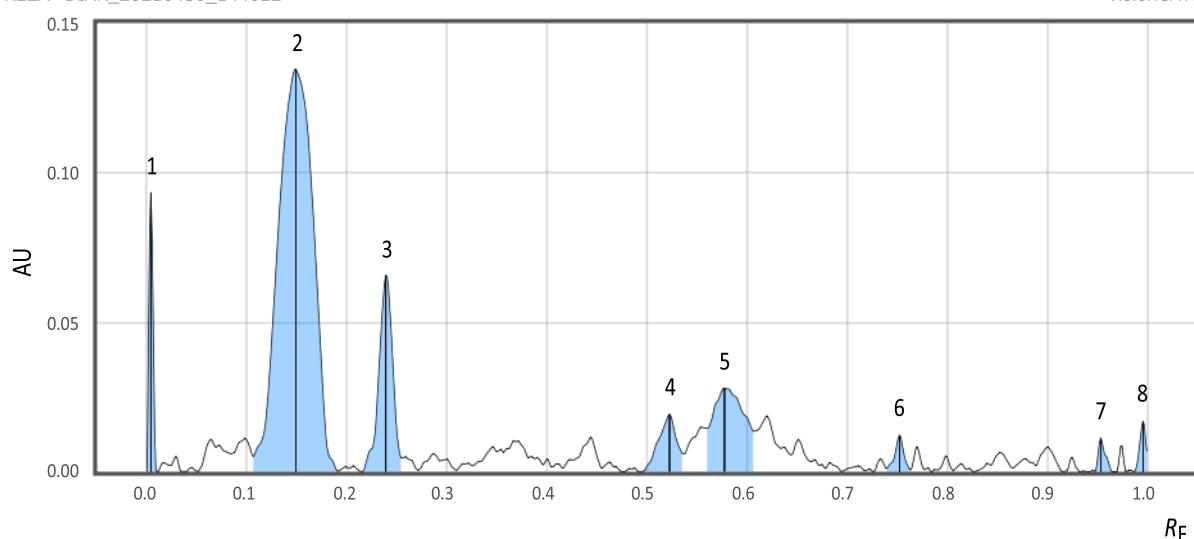


Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.004	0.1015	25.14	0.011	0.0000	0.00051	4.61	No	
2	0.095	0.0000	0.152	0.1907	47.24	0.180	0.0045	0.00795	71.59	No	kafein
3	0.426	0.0007	0.440	0.0237	5.87	0.459	0.0077	0.00040	3.61	No	
4	0.580	0.0070	0.632	0.0443	10.98	0.664	0.0028	0.00167	15.06	No	
5	0.734	0.0000	0.752	0.0131	3.23	0.764	0.0019	0.00017	1.51	No	
6	0.875	0.0059	0.892	0.0168	4.17	0.905	0.0021	0.00029	2.65	No	
7	0.938	0.0000	0.949	0.0136	3.37	0.959	0.0000	0.00011	0.96	No	

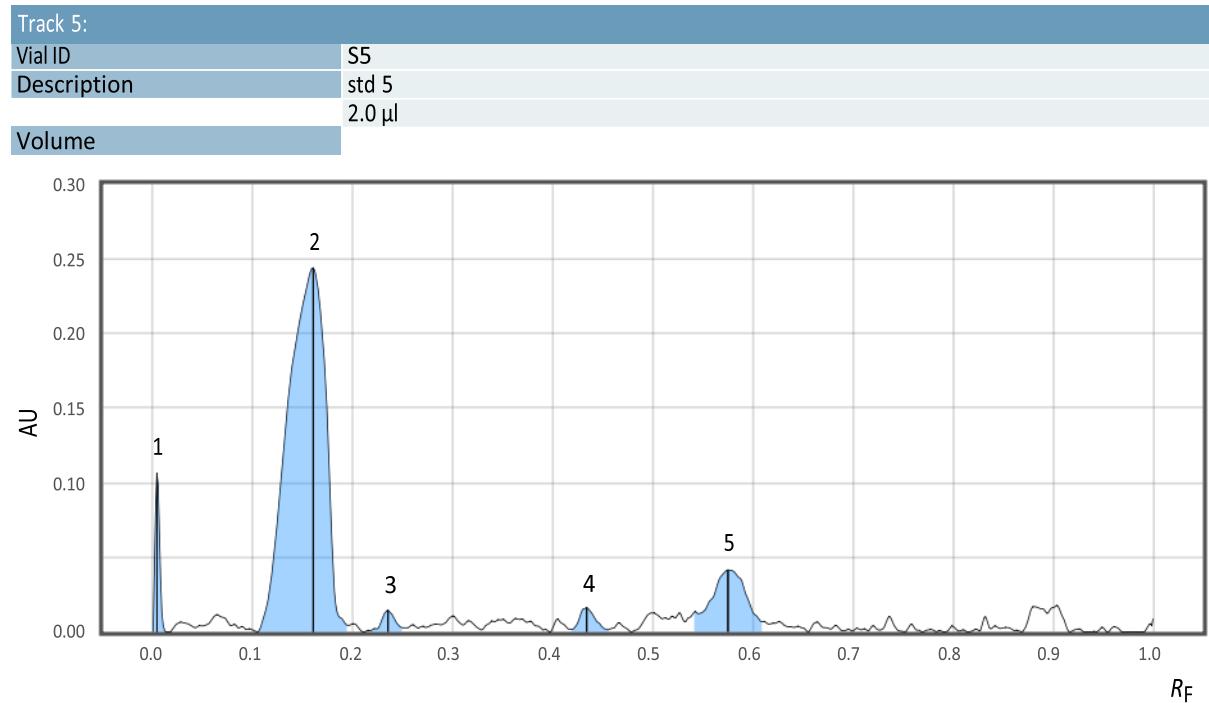


REZA DIAR_20210430_144022

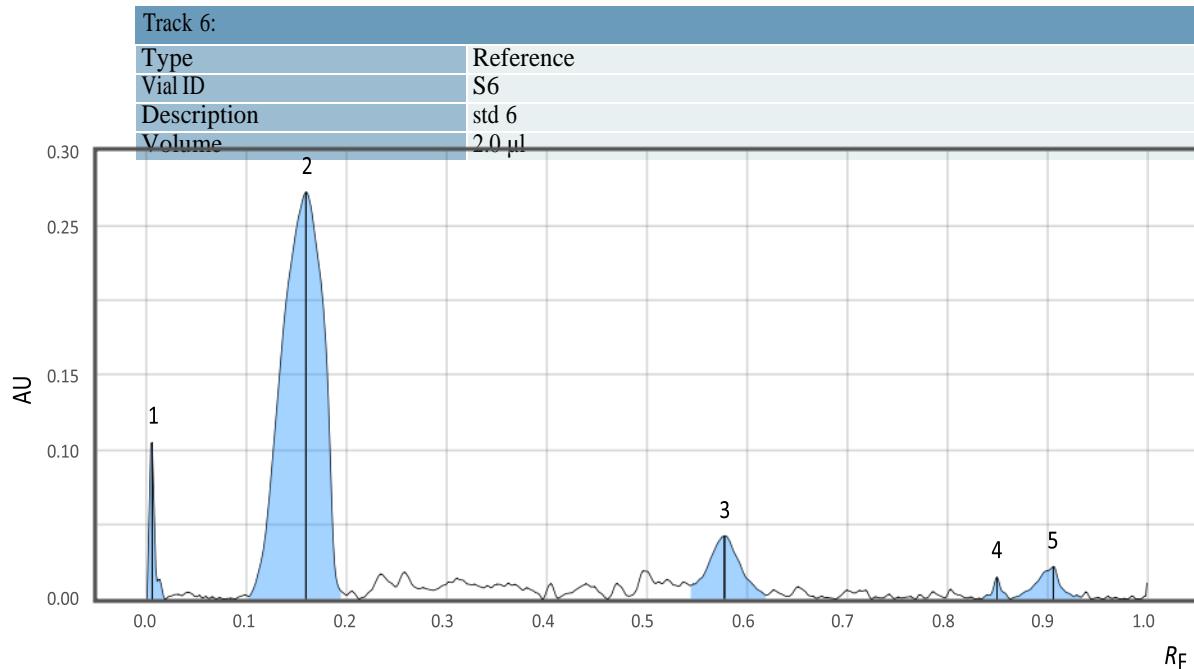
visionCATS



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual	Substance Name
	R_F	H	R_F		%	R_F	H	A			
1	0.000	0.0000	0.004	0.0932	24.47	0.010	0.0000	0.00044	5.04	No	
2	0.106	0.0051	0.149	0.1346	35.32	0.191	0.0002	0.00545	62.94	No	
3	0.215	0.0000	0.239	0.0657	17.24	0.255	0.0046	0.00104	11.96	No	
4	0.492	0.0000	0.522	0.0192	5.03	0.536	0.0059	0.00040	4.57	No	
5	0.560	0.0145	0.578	0.0279	7.32	0.606	0.0135	0.00102	11.73	No	
6	0.740	0.0011	0.752	0.0122	3.21	0.764	0.0007	0.00013	1.45	No	
7	0.943	0.0000	0.954	0.0113	2.96	0.965	0.0000	0.00009	1.03	No	
8	0.988	0.0000	0.996	0.0169	4.44	1.000	0.0068	0.00011	1.29	No	



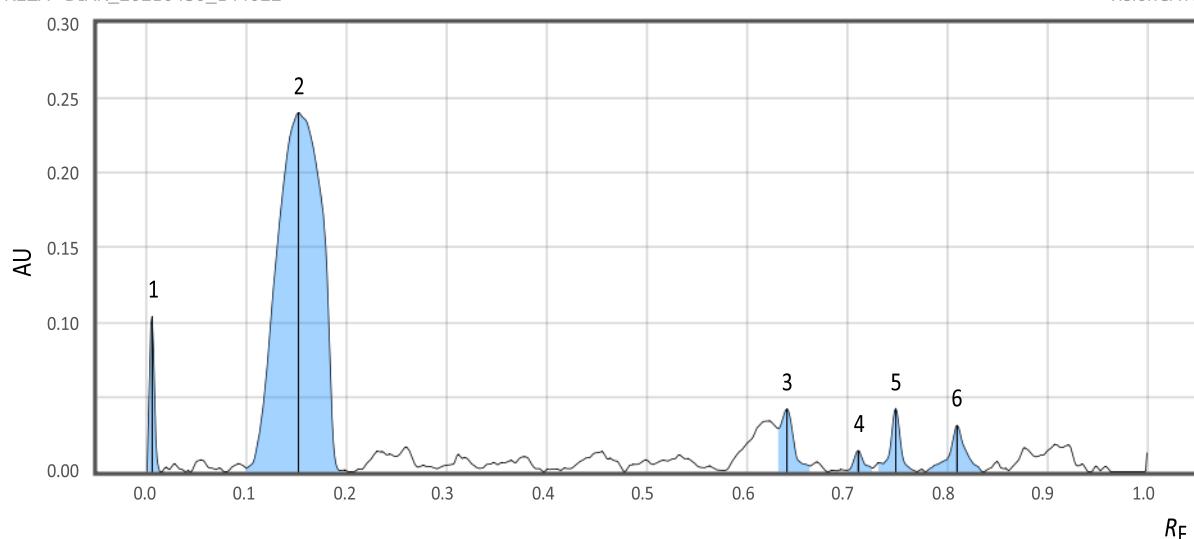
Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.004	0.1062	25.17	0.013	0.0000	0.00056	4.16	No	
2	0.104	0.0000	0.160	0.2439	57.78	0.195	0.0043	0.01064	79.05	No	kafein
3	0.217	0.0007	0.235	0.0144	3.41	0.254	0.0026	0.00024	1.75	No	
4	0.419	0.0016	0.434	0.0161	3.82	0.455	0.0013	0.00030	2.22	No	
5	0.539	0.0109	0.575	0.0414	9.82	0.609	0.0069	0.00172	12.81	No	



Peak #	Start			Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%			
1	0.000	0.0000	0.005	0.1048	23.00	0.018	0.0000	0.00064	3.97	No		
2	0.101	0.0016	0.159	0.2723	59.78	0.199	0.0025	0.01319	81.66	No	kafein	
3	0.544	0.0089	0.578	0.0422	9.26	0.619	0.0025	0.00160	9.88	No		
4	0.835	0.0000	0.850	0.0146	3.20	0.864	0.0000	0.00014	0.88	No		
5	0.864	0.0000	0.906	0.0217	4.77	0.934	0.0012	0.00058	3.62	No		

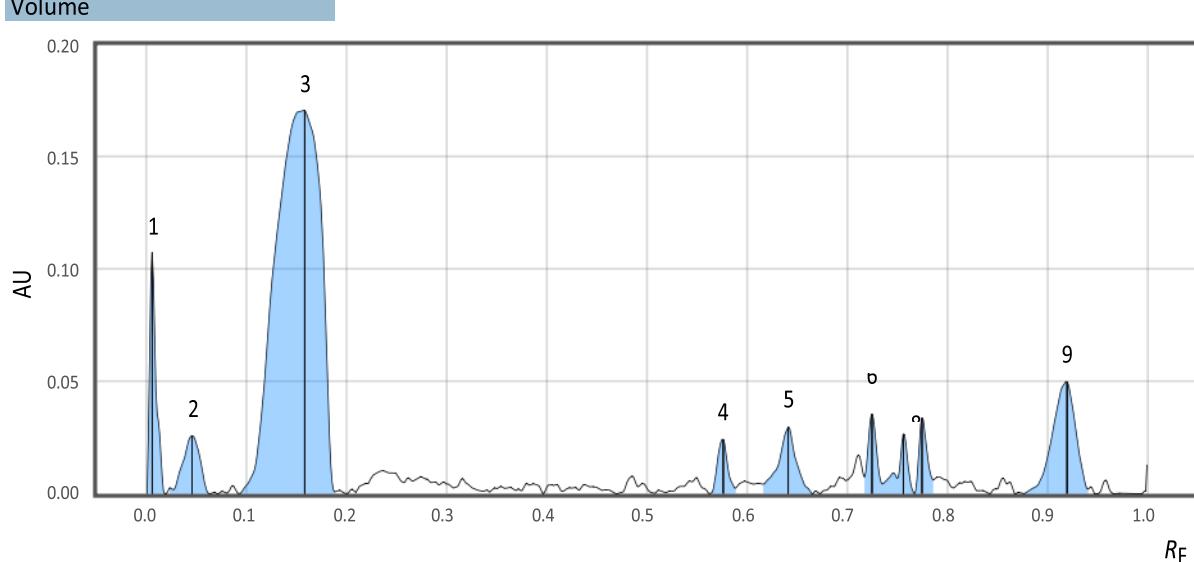
Type	Sample
Vial ID	SP 1
Description	smp1
Volume	2.0 µl

REZA DIAR_20210430_144022



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R_F	H	R_F	H	%	R_F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.005	0.1036	21.90	0.014	0.0000	0.00058	3.85	No	
2	0.099	0.0025	0.151	0.2402	50.74	0.193	0.0007	0.01250	83.45	No	kafein
3	0.631	0.0288	0.640	0.0420	8.87	0.662	0.0039	0.00065	4.34	No	
4	0.700	0.0009	0.711	0.0141	2.99	0.726	0.0025	0.00017	1.11	No	
5	0.730	0.0051	0.749	0.0424	8.96	0.769	0.0003	0.00051	3.38	No	
6	0.779	0.0000	0.810	0.0310	6.55	0.836	0.0000	0.00058	3.87	No	

Track 8:
 Vial ID: SP 2
 Description: smpl 2
 Volume: 2.0 μ l



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.005	0.1076	21.35	0.018	0.0000	0.00078	5.75	No	
2	0.020	0.0005	0.045	0.0258	5.12	0.063	0.0000	0.00051	3.75	No	
3	0.092	0.0000	0.158	0.1709	33.91	0.188	0.0008	0.00898	66.58	No	kafein
4	0.563	0.0000	0.576	0.0242	4.81	0.589	0.0025	0.00029	2.12	No	
5	0.616	0.0043	0.641	0.0297	5.90	0.665	0.0000	0.00061	4.50	No	
6	0.718	0.0075	0.725	0.0355	7.04	0.735	0.0044	0.00035	2.59	No	
7	0.735	0.0044	0.756	0.0266	5.27	0.767	0.0000	0.00033	2.44	No	
8	0.767	0.0000	0.775	0.0338	6.70	0.786	0.0061	0.00032	2.38	No	
9	0.876	0.0000	0.920	0.0499	9.91	0.941	0.0021	0.00133	9.89	No	

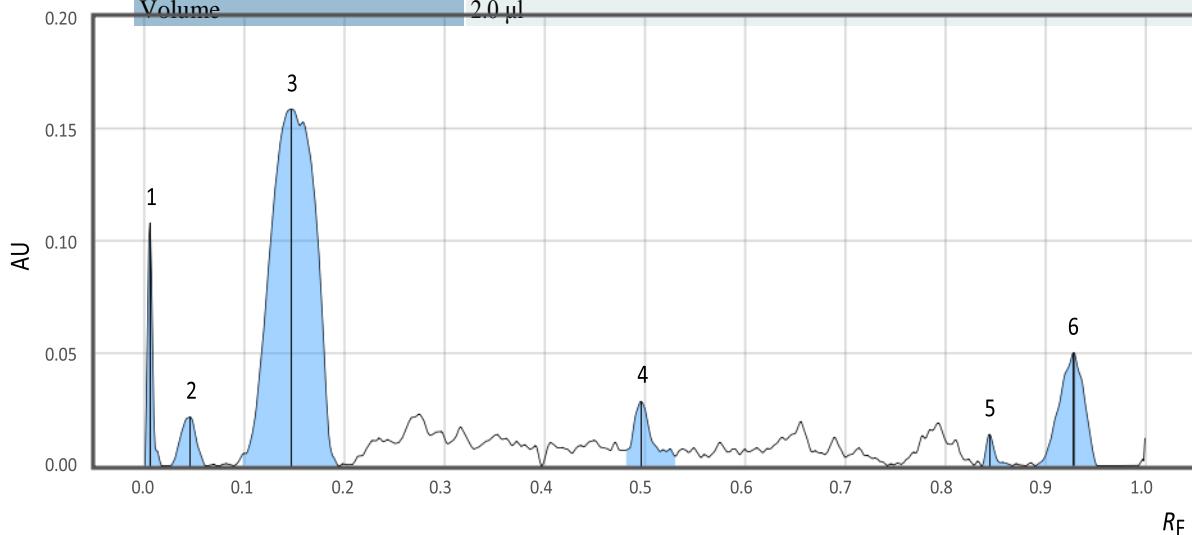
Track 9:

Type Sample

Vial ID SP 3

Description smpl 3

Volume 2.0 µl

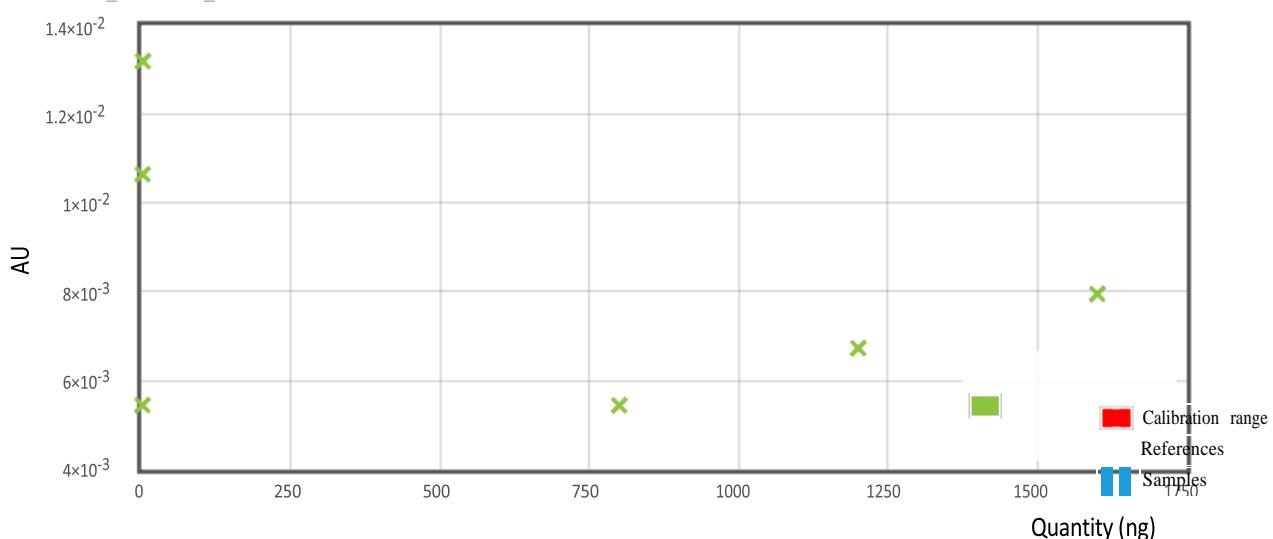


Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.005	0.1082	28.34	0.016	0.0000	0.00061	5.25	No	
2	0.024	0.0000	0.045	0.0218	5.70	0.061	0.0000	0.00039	3.33	No	
3	0.095	0.0029	0.146	0.1590	41.62	0.194	0.0000	0.00841	72.16	No	kafein
4	0.477	0.0068	0.496	0.0286	7.49	0.530	0.0042	0.00068	5.81	No	
5	0.836	0.0000	0.845	0.0139	3.65	0.868	0.0000	0.00014	1.16	No	
6	0.890	0.0000	0.929	0.0504	13.20	0.953	0.0000	0.00143	12.29	No	

Calibration results:

Area calibration for substance kafein @ 254 nm:

REZA DIAR_20210430_144022



Regression mode	Polynomial
Range deviation	0.00 %
Related substances	Default
Number of references	6
Calibration function	$y=0x^2+0x+0$
Coefficient of variation	CV 0.00 %
Correlation coefficient	n/a
	The polynomial function is invalid (the computed x-square factor was positive or the curve's derivative was negative in the area of computation).

Results:

Substance having no available results



kafein

The polynomial function is invalid (the computed x-square factor was positive or the curve's derivative was negative in the area of computation).

A track marked with means: this result is outside the regression range given by the reference assignments, but is included in the results because it is in the allowed range deviation.

Evaluation 2 :

Locked	No
Step	Scan developed lempenge 1c
Concentration unit type	Mass / volume
Notes	

Definition:

References:

S1

Substance Name	Concentration	Purity
----------------	---------------	--------

S2

REZA DIAR_20210430_144022

Substance Name	Concentration	Purity
S3		
Substance Name	Concentration	Purity

S4

Substance Name	Concentration	Purity
----------------	---------------	--------

S5

Substance Name	Concentration	Purity
----------------	---------------	--------

S6

Substance Name	Concentration	Purity
----------------	---------------	--------

Samples:

Vial ID	Amount	Volume solution	Reference amount	Related to
SP 1		0.00 ml		
SP 2		0.00 ml		
SP 3		0.00 ml		

Integration parameters:

Bounds	[0.000,1.000]
Smoothing	Savitzky-Golay of order 3 and window 7
Baseline correction	Lowest slope with noise 0.05
Profile subtraction	None
Peaks detection	Gauss (legacy) with sensitivity 0.1, separation 1 and threshold 0.1

Calibration results:**Results:****Evaluation 3 :**

Locked	No
Step	Scan developed lempenge 1c
Concentration unit type	Mass / volume
Notes	

Definition:**References:****S1**

Substance Name	Concentration	Purity
----------------	---------------	--------

S2

Substance Name	Concentration	Purity
----------------	---------------	--------

S3

Substance Name	Concentration	Purity
----------------	---------------	--------

S4

Substance Name	Concentration	Purity
----------------	---------------	--------

S5

Substance Name	Concentration	Purity
----------------	---------------	--------



World Leader in Planar Chromatography

visionCATS

REZA DIAR_20210430_144022

S6	Concentration	Purity
Substance Name		

Samples:

Vial ID	Amount	Volume solution	Reference amount	Related to
SP 1		0.00 ml		
SP 2		0.00 ml		
SP 3		0.00 ml		

Integration parameters:

Bounds	[0.000,1.000]
Smoothing	Savitzky-Golay of order 3 and window 7
Baseline correction	Lowest slope with noise 0.05
Profile subtraction	None
Peaks detection	Gauss (legacy) with sensitivity 0.1, separation 1 and threshold 0.1

Calibration results:**Results:****Evaluation 4 :**

Locked	No
Step	Scan developed lempenge 1e
Concentration unit type	Mass / volume
Notes	

Definition:**References:**

S1

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	400.000 µg/ml	100.00 %

S2

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	600.000 µg/ml	100.00 %

S3

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	800.000 µg/ml	100.00 %

S4

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	1.000 µg/ml	100.00 %

S5

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	1.200 µg/ml	100.00 %

S6

Substance Name	Concentration	Purity
kafein	1.400 µg/ml	100.00 %

Samples:

Vial ID	Amount	Volume solution	Reference amount	Related to
SP 1	768.000 mg	0.00 ml	0.000 mg	
SP 2	792.000 mg	0.00 ml	0.000 mg	
SP 3	812.000 mg	0.00 ml	0.000 mg	

Integration parameters:

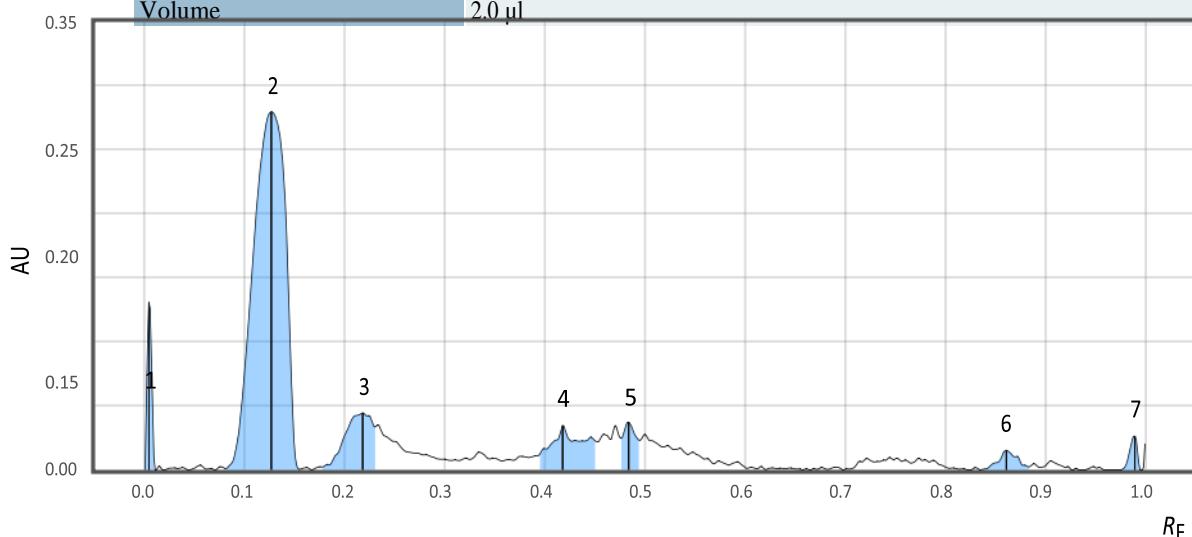
Bounds	[0.000,1.000]
Smoothing	Savitzky-Golay of order 3 and window 7
Baseline correction	Lowest slope with noise 0.05
Profile subtraction	None
Peaks detection	Gauss (legacy) with sensitivity 0.1, separation 1 and threshold 0.1

Scan:

Wavelength 275 nm

Track 1:

Type	Reference
Vial ID	S1
Description	std 1
Volume	2.0 μ l

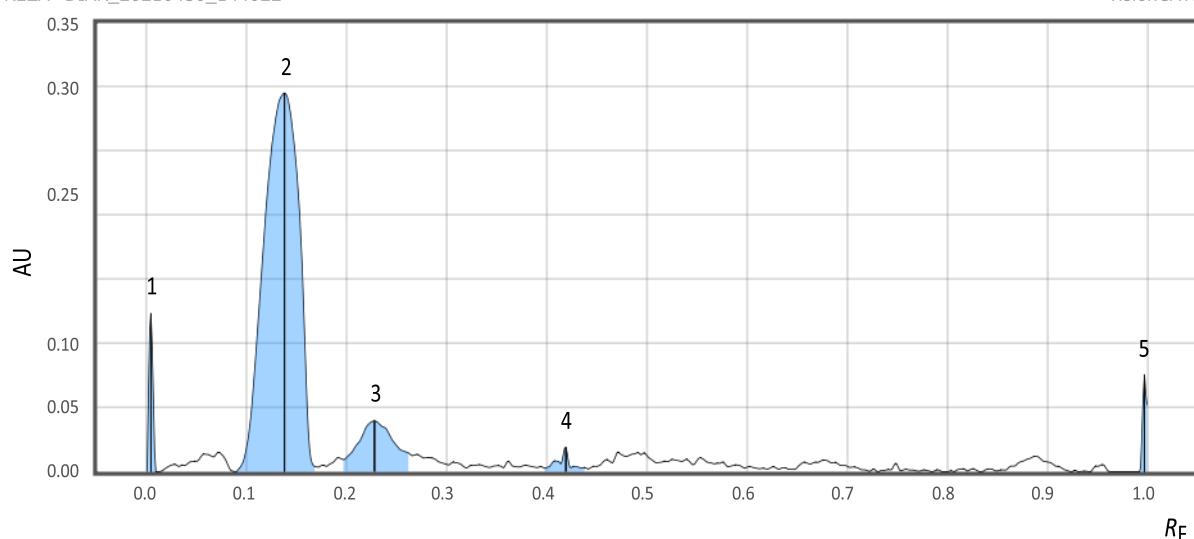


Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.004	0.1308	23.01	0.010	0.0000	0.00068	4.52	No	
2	0.080	0.0010	0.126	0.2798	49.22	0.155	0.0004	0.01048	69.74	No	kafein
3	0.177	0.0022	0.217	0.0445	7.82	0.230	0.0335	0.00143	9.51	No	
4	0.395	0.0126	0.417	0.0346	6.08	0.453	0.0219	0.00132	8.76	No	
5	0.476	0.0246	0.484	0.0372	6.55	0.495	0.0230	0.00057	3.76	No	
6	0.835	0.0000	0.861	0.0153	2.68	0.884	0.0022	0.00033	2.19	No	
7	0.976	0.0000	0.990	0.0263	4.63	0.995	0.0000	0.00023	1.52	No	

Track 2:

Type	Reference
Vial ID	S2
Description	std 2
Volume	2.0 μ l

REZA DIAR_20210430_144022

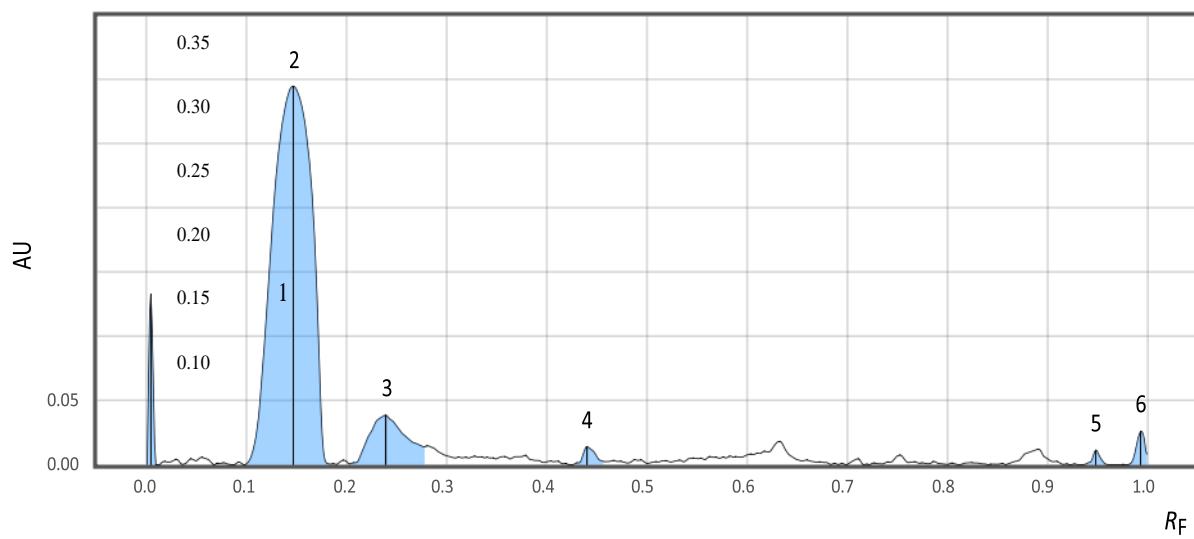


Peak #	Start			Max			End		Area			Manual peak	Substance Name
	R_F	H	R_F	H	%	R_F	H	A	%				
1	0.000	0.0000	0.004	0.1235	22.33	0.009	0.0000	0.00057	3.83	No			
2	0.089	0.0000	0.138	0.2954	53.41	0.170	0.0038	0.01205	80.79	No	kafein		
3	0.196	0.0094	0.228	0.0397	7.17	0.265	0.0125	0.00171	11.47	No			
4	0.398	0.0027	0.419	0.0189	3.43	0.441	0.0020	0.00027	1.81	No			
5	0.993	0.0000	0.998	0.0756	13.66	1.000	0.0520	0.00031	2.10	No			

Track 3:

Vial ID	S3
Description	std 3
	2.0 μ l

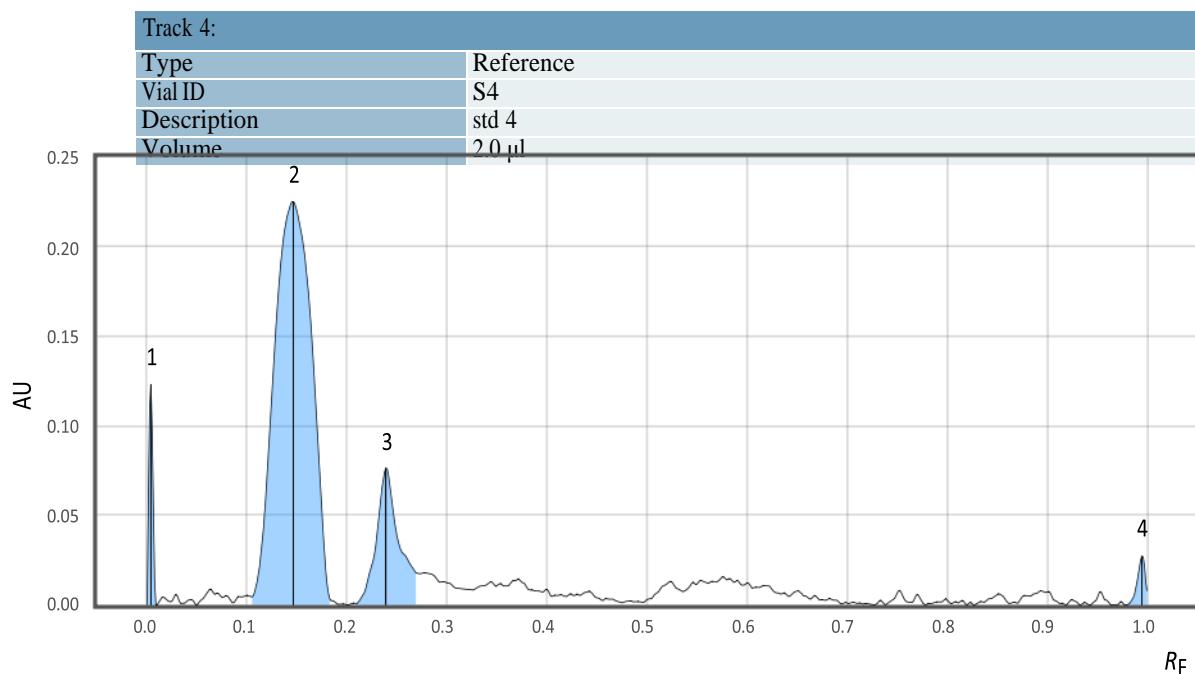
Volume



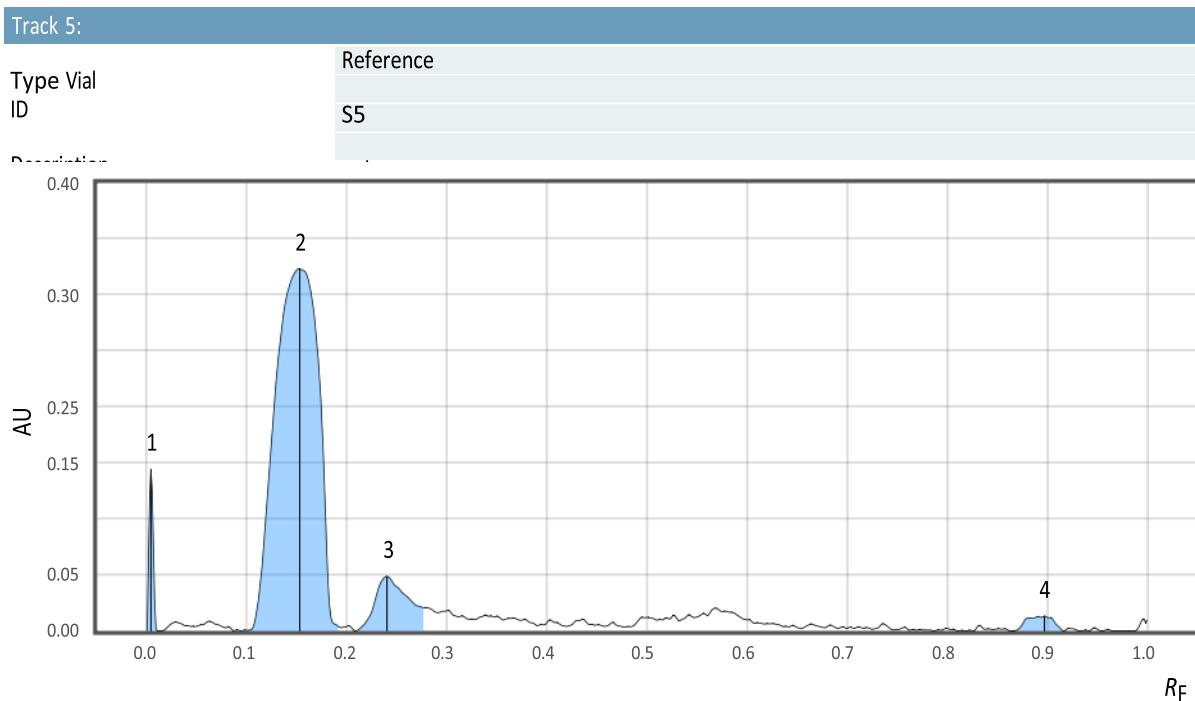
Peak #	Start			Max			End		Area			Manual peak	Substance Name
	R_F	H	R_F	H	%	R_F	H	A	%				
1	0.000	0.0000	0.004	0.1330	25.66	0.009	0.0000	0.00061	3.79	No			
2	0.098	0.0000	0.146	0.2953	56.95	0.182	0.0005	0.01343	82.71	No	kafein		
3	0.203	0.0005	0.239	0.0386	7.45	0.278	0.0138	0.00164	10.11	No			

4	0.425	0.0000	0.440	0.0143	2.75	0.458	0.0024	0.00020	1.25	No	
5	0.935	0.0000	0.949	0.0114	2.21	0.963	0.0000	0.00010	0.60	No	
6	0.981	0.0000	0.994	0.0258	4.98	1.000	0.0080	0.00025	1.53	No	

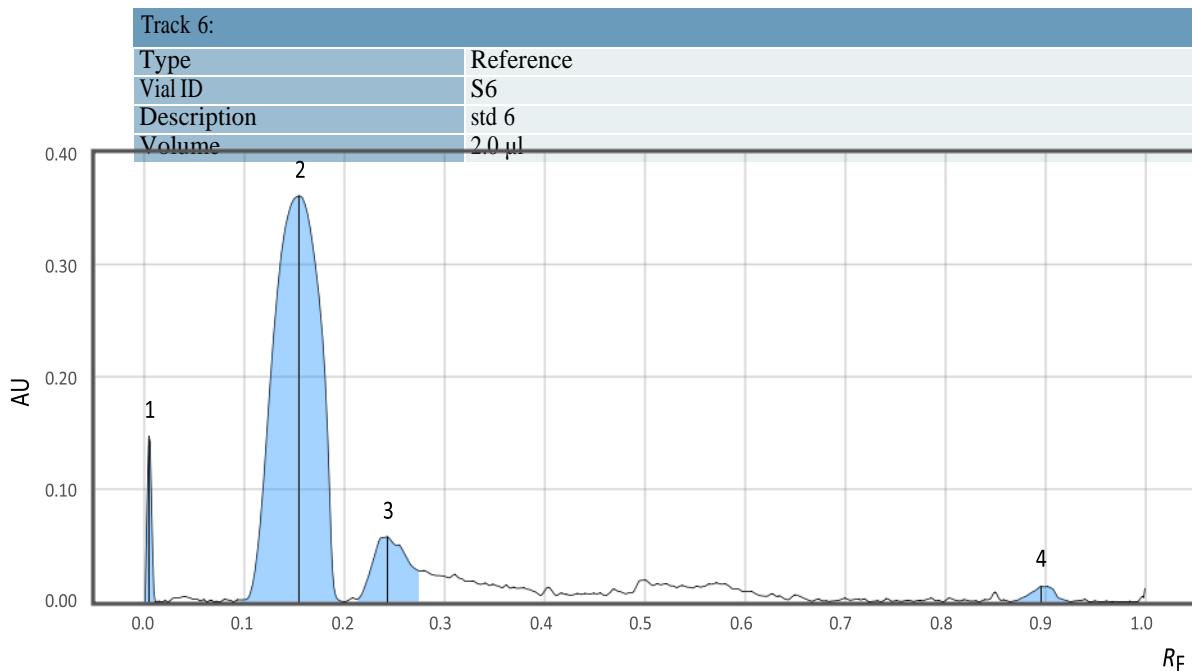
REZA DIAR_20210430_144022



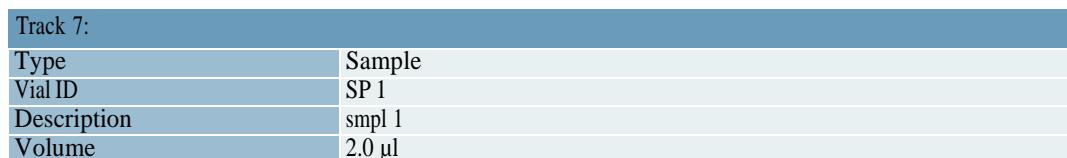
Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R_F	H	R_F	H	%	R_F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.004	0.1231	27.24	0.009	0.0000	0.00056	4.45	No	
2	0.105	0.0044	0.146	0.2251	49.84	0.184	0.0024	0.00979	77.58	No	kafein
3	0.203	0.0002	0.239	0.0762	16.88	0.271	0.0174	0.00203	16.08	No	
4	0.980	0.0000	0.995	0.0273	6.04	1.000	0.0078	0.00024	1.89	No	



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.004	0.1443	27.25	0.010	0.0000	0.00069	3.56	No	
2	0.094	0.0000	0.152	0.3234	61.08	0.194	0.0028	0.01633	84.68	No	kafein
3	0.209	0.0000	0.240	0.0486	9.18	0.276	0.0207	0.00186	9.62	No	
4	0.868	0.0000	0.897	0.0132	2.48	0.916	0.0000	0.00041	2.14	No	

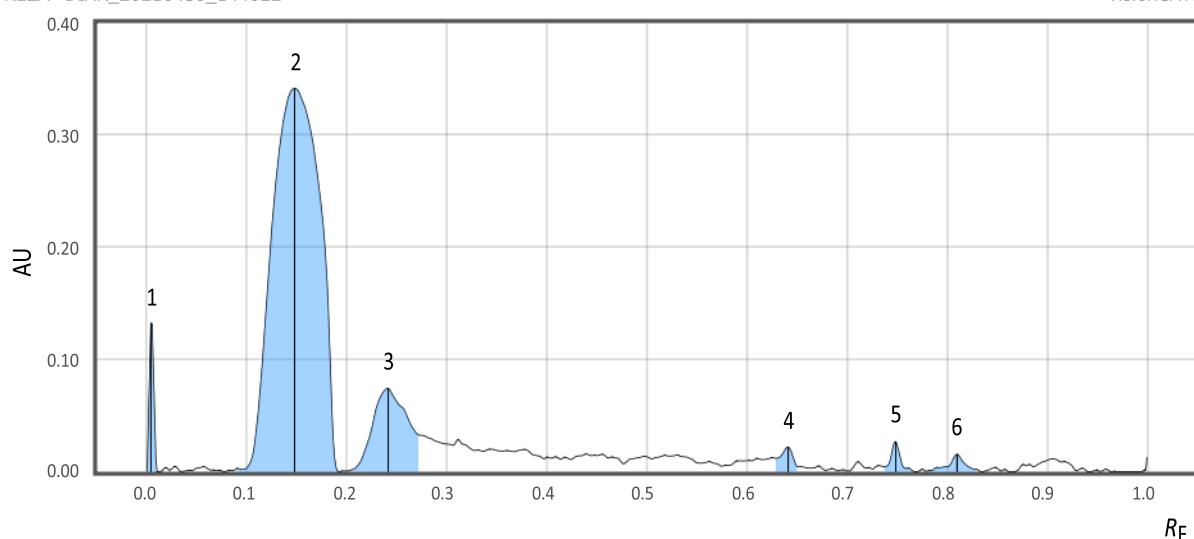


Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.004	0.1477	25.42	0.010	0.0000	0.00075	3.24	No	
2	0.096	0.0017	0.154	0.3618	62.28	0.199	0.0000	0.01964	84.79	No	kafein
3	0.212	0.0021	0.242	0.0578	9.95	0.275	0.0272	0.00239	10.30	No	
4	0.865	0.0000	0.896	0.0137	2.35	0.926	0.0000	0.00038	1.66	No	



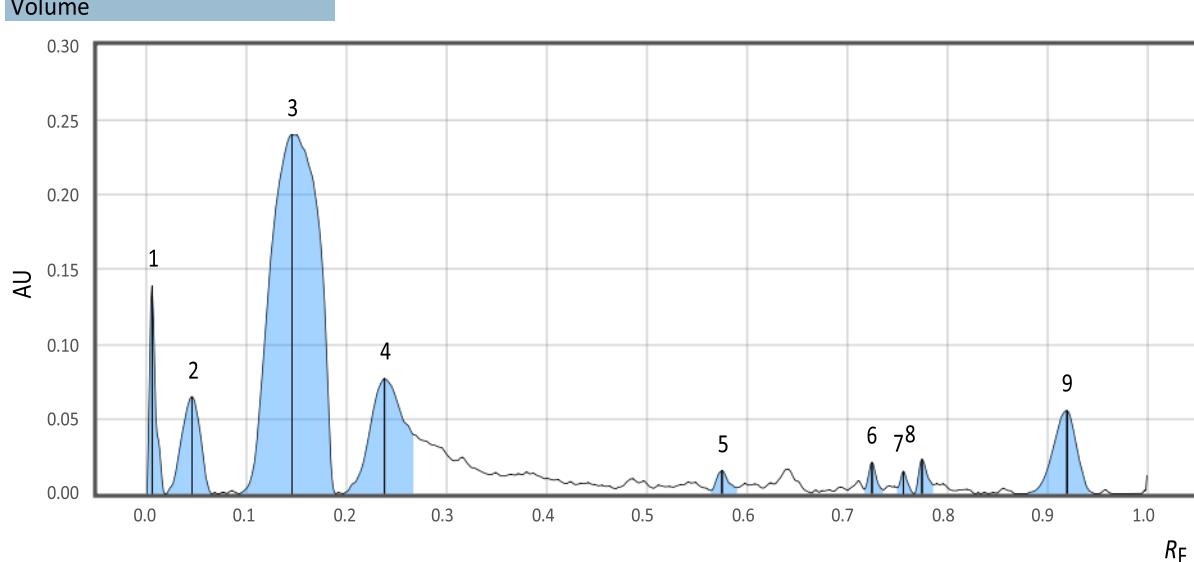
REZA DIAR_20210430_144022

visionCATS



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R_F	H	R_F	H	%	R_F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.004	0.1323	21.59	0.010	0.0000	0.00069	2.92	No	
2	0.087	0.0015	0.147	0.3416	55.76	0.193	0.0000	0.01893	80.44	No	kafein
3	0.194	0.0004	0.241	0.0743	12.13	0.273	0.0325	0.00299	12.72	No	
4	0.629	0.0119	0.641	0.0220	3.59	0.654	0.0044	0.00034	1.44	No	
5	0.738	0.0042	0.749	0.0268	4.38	0.769	0.0000	0.00029	1.24	No	
6	0.779	0.0004	0.810	0.0156	2.54	0.834	0.0000	0.00029	1.24	No	

Track 8:
 Vial ID: SP 2
 Description: smpl 2
 Volume: 2.0 μ l



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.005	0.1390	21.36	0.018	0.0000	0.00097	4.60	No	
2	0.019	0.0000	0.045	0.0648	9.95	0.065	0.0000	0.00140	6.66	No	
3	0.092	0.0000	0.145	0.2402	36.90	0.189	0.0000	0.01334	63.56	No	kafein
4	0.195	0.0000	0.237	0.0769	11.82	0.266	0.0395	0.00299	14.25	No	
5	0.564	0.0021	0.575	0.0155	2.38	0.590	0.0041	0.00023	1.08	No	
6	0.718	0.0029	0.725	0.0211	3.23	0.736	0.0026	0.00020	0.95	No	
7	0.750	0.0040	0.756	0.0150	2.31	0.767	0.0000	0.00013	0.60	No	
8	0.767	0.0000	0.775	0.0230	3.54	0.786	0.0059	0.00023	1.12	No	
9	0.880	0.0000	0.920	0.0554	8.52	0.948	0.0000	0.00151	7.18	No	

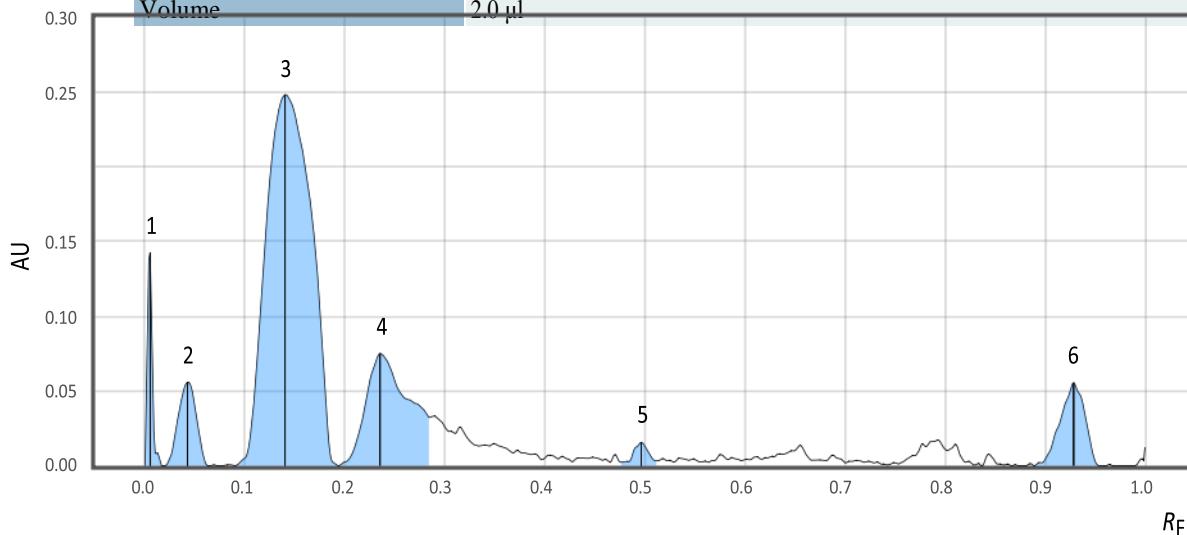
Track 9:

Type Sample

Vial ID SP 3

Description smpl 3

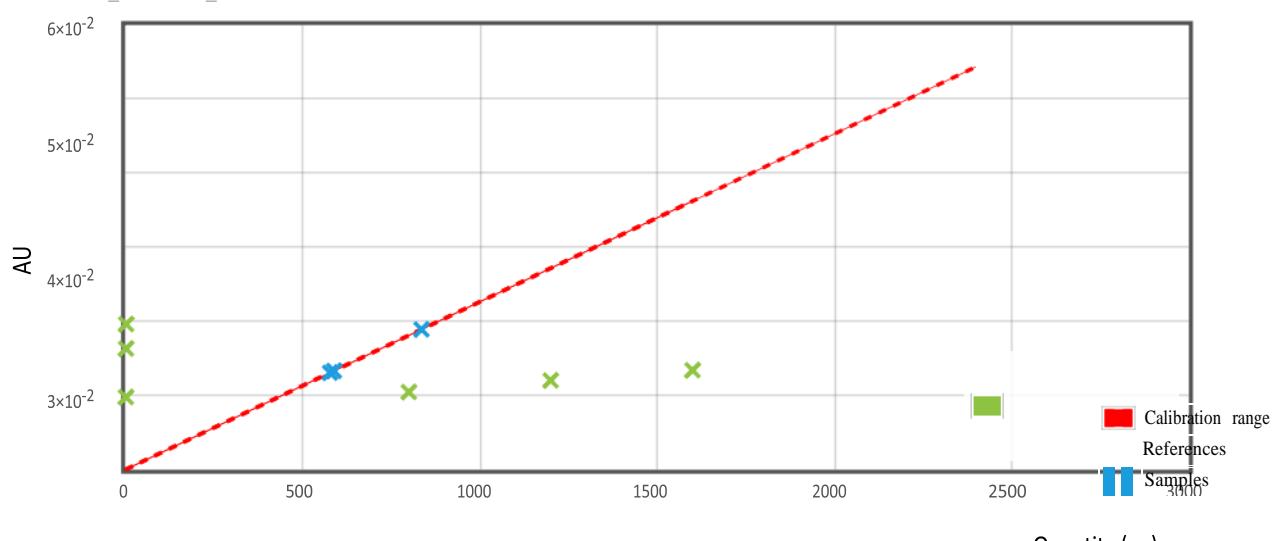
Volume 2.0 µl



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.005	0.1423	24.03	0.018	0.0000	0.00080	3.87	No	
2	0.020	0.0000	0.043	0.0558	9.43	0.063	0.0000	0.00116	5.62	No	
3	0.090	0.0000	0.140	0.2480	41.88	0.193	0.0002	0.01309	63.37	No	kafein
4	0.194	0.0000	0.235	0.0751	12.68	0.285	0.0323	0.00376	18.19	No	
5	0.476	0.0023	0.496	0.0156	2.63	0.512	0.0032	0.00028	1.38	No	
6	0.890	0.0000	0.929	0.0554	9.36	0.955	0.0000	0.00156	7.57	No	

Calibration results:

Area calibration for substance kafein @ 275 nm:



Regression mode

Linear-1

Range deviation

50.00 %

Related substances

Default

Number of references

6

Calibration function

$$y = 2.266 \times 10^{-8} x$$

Coefficient of variation

CV 118.07 %

Correlation coefficient

R=NaN

Results:

kafein (3 sample assignments) @ 275 nm			
Sample 'SP 1'	417.9 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 2.0 µl	417.9 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 7	417.9 µg/ml	835.7 ng	
Sample 'SP 2'	294.4 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 2.0 µl	294.4 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 8	294.4 µg/ml	588.8 ng	
Sample 'SP 3'	288.9 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 2.0 µl	288.9 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 9	288.9 µg/ml	577.7 ng	

A track marked with ⚠ means: this result is outside the regression range given by the reference assignments, but is included in the results because it is in the allowed range deviation.

Analyst:

Reviewer: