

VALIDASI METODE ANALISIS *HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC) PADA PENETAPAN KADAR ALKALOID EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)

SKRIPSI



Oleh :
Retno Eka Lestari
NIM 19040110

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

VALIDASI METODE ANALISIS *HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC) PADA PENETAPAN KADAR ALKALOID EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh :
Retno Eka Lestari
NIM 19040110

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

LEMBAR PERSETUJUAN

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

Jember, 28 Maret 2023

Pembimbing Utama,



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm.
NIDN. 07030668903

Pembimbing Anggota,



apt. Dina Trianggaluh Fauziah, M.Farm.
NIDN. 0703028901

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul *Validasi Metode Analisis High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) pada Penetapan Kadar Alkaloid Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (Coffea Canephora)* telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada :

Nama : Retno Eka Lestari

NIM 19040110

Hari, Tanggal : Kamis, 13 April 2023

Program Studi : Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi

Tim Penguji
Ketua Penguji,


Sutrisno, S.ST., M.M.
NIDN 40060355

Penguji II,


apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm.
NIDN. 07030668903

Penguji III


apt. Dina Trianggaluh Fauziah, M.Farm.
NIDN. 0703028901

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan,
Universitas dr. Soebandi


apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm
NIDN. 07030668903

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Retno Eka Lestari

NIM : 19040110

Program Studi : Sarjana Farmasi

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

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain atau ditemukan adanya pelanggaran terhadap etika keilmuan dalam skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Jember, 13 April 2023

Yang menyatakan,



(Retno Eka Lestari)

SKRIPSI

VALIDASI METODE ANALISIS *HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC) PADA PENETAPAN KADAR ALKALOID EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea Canephora*)

Oleh:

Retno Eka Lestari

NIM. 19040110

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : apt. Dina Trianggaluh Fauziah, M.Farm.

PERSEMBAHAN

Skripsi ini dengan sepenuh hati saya persembahkan kepada:

1. Allah SWT yang selalu memberikan kemudahan dan kelancaran dalam penyusunan skripsi ini.
2. Skripsi ini saya persembahkan kepada kedua orang tua saya yang sangat berjasa dalam hidup saya, serta keluarga besar terimakasih yang telah selalu memberikan doa, kasih sayang, nasihat, pengorbanan waktu dan materil yang senantiasa memberikan dukungan sehingga membuat segala sesuatu mengenai skripsi dapat selesai dengan baik.
3. Ibu apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku dosen pembimbing utama, Ibu apt. Dina Trianggaluh Fauziah, M.Farm selaku dosen pembimbing anggota, dan bapak Sutrisno, S.ST., M.M. selaku dosen penguji saya yang telah bersedia meluangkan waktunya dalam memberikan bimbingan dan arahan dalam proses penyusunan skripsi ini.
4. Kepada segenap Ibu dan Bapak Dosen Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi yang telah memberikan banyak ilmu dan pengalaman selama perkuliahan, terutama ibu apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku wali kelas dan ibu apt. Sholihatil Hidayati, M.Farm selaku DPA yang sangat sabar membimbing dalam proses perkuliahan.
5. Terima kasih kepada R yang selalu menjadi pendengar keluh kesah selama pengerjaan skripsi ini dan selalu menjadi penyemangat.
6. Terimakasih juga kepada teman-teman terdekat dan anak himpunanku yang telah banyak membantu dan menemani selama menempuh pendidikan

farmasi di Universitas dr. Soebandi, canda, tawa, dan banyak momen yang telah kita lewati bersama.

7. Teman kuliah satu angkatan terutama kelas 19C Farmasi terimakasih untuk perjuangan yang telah kita lewati bersama dan sukses untuk kita semua.
8. Kepada rekan-rekan dan staf di Laboratorium Farmasi yang menerima dengan sepenuh hati sehingga membantu kelancaran dalam proses penyelesaian skripsi ini.
9. Terima Kasih untuk diri saya sendiri yang telah berjuang dan berusaha untuk menyelesaikan semua tahap pada perkuliahan hingga selesai.

MOTTO

*"It's not always easy, but that's life. Be strong because there are better days
ahead"* – Mark Lee

ABSTRAK

Eka Lestari, Retno* Setyaningrum, Lindawati** Trianggaluh Fauziah, Dina***. 2023. **Validasi Metode Analisis *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) pada Penetapan Kadar Alkaloid Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*)**. Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.

Latar Belakang: kopi robusta (*Coffea canephora*) merupakan salah satu produk potensian di Indonesia karena memiliki berbagai senyawa aktif. Salah satu senyawa tersebut adalah golongan alkaloid yang memiliki turunan kafein yang berperan sebagai peningkat konsentrasi. *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan suatu metode yang digunakan untuk pemisahan senyawa secara selektif dalam suatu sampel dengan parameter selektivitas, linieritas, LOD & LOQ, akurasi, dan presisi. Tujuan penelitian ini untuk melakukan validasi metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Metode: Desain penelitian ini adalah *true experimental* dengan metode analisis *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) untuk melakukan penetapan kadar alkaloid. Sampel yang digunakan adalah serbuk biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Kondisi *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan menggunakan fase diam kolom *poroshell C-18*.

Hasil Penelitian: hasil optimasi metode analisis yang diperoleh yaitu laju alir 1,0 mL/menit, fase gerak metanol:*aquabidestilata* (70:30) diamati pada panjang gelombang 272 nm. Hasil penelitian menunjukkan uji validasi memenuhi persyaratan parameter meliputi uji presisi %KV konsentrasi 80% 0,015012755%, konsentrasi 100% 0,026568482%, konsentrasi 120% 0,02921687%, uji akurasi menghasilkan %*recovery* berkisar 100%, selektivitas yang baik, linieritas dengan $r = 0,9984$ serta nilai LOD 3.509845843 ppm dan LOQ 10.6358965 ppm. Penetapan kadar dengan metode ini memperoleh rata-rata kadar alkaloid \pm SD yaitu 4.46005229 ± 0.441239 .

Kesimpulan: metode analisis *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dapat digunakan untuk penetapan kadar alkaloid pada kopi robusta (*Coffea canephora*).

Kata Kunci: Kopi Robusta, alkaloid, HPLC, validasi metode, dan penetapan kadar

ABSTRACT

Eka Lestari, Retno* Setyaningrum, Lindawati** Trianggaluh Fauziah, Dina***. 2023. **Validation Of Analysis Method *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) and Determination An Alkaloid Content Of Ethanol Extract Robusta Coffee Beans (*Coffea Canephora*)**. Essay. Pharmacy Undergraduate Study Program, University of dr. Soebandi.

Introduction: Robusta coffee (*Coffea canephora*) is one of the potential products in Indonesia because it has various active compounds. One of these compounds is an alkaloid class that has a caffeine derivative that acts as a concentration enhancer. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) is a method used for selective separation of compounds in a sample with selectivity, linearity, LOD & LOQ, accuracy, and precision parameters. The purpose of this study was to validate the High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) method.

Methods: This research design is true experimental with High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis method to determine alkaloid levels. The sample used is robusta coffee bean powder (*Coffea canephora*). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) conditions using C-18 poroshell column stationary phase.

Results and Analysis: The optimization results of the analytical method obtained were flow rate of 1.0 mL/min, mobile phase methanol: aquabidestilata (70:30) observed at a wavelength of 272 nm. The results showed that the validation test met the parameter requirements including precision test %KV 80% concentration 0.015012755%, 100% concentration 0.026568482%, 120% concentration 0.02921687%, accuracy test resulted in %recovery around 100%, good selectivity, linearity with $r = 0.9984$ and LOD values of 3,509845843 ppm and LOQ 10,6358965 ppm. Determination of levels with this method obtained the average alkaloid content \pm SD which is 4.46005229 ± 0.441239 .

Conclusion: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) analytical method can be used for the determination of alkaloid levels in robusta coffee (*Coffea canephora*).

Keywords: Robusta coffee, alkaloids, HPLC, method validation and determination of levels

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji dan syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penyusunan Tugas Akhir ini dapat terselesaikan. Tugas Akhir ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan menyelesaikan pendidikan Program Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi dengan judul “Validasi Metode Analisis *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) pada Penetapan Kadar Alkaloid Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*)”.

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

1. Bapak Andi Eka Pranata, S.ST., S.Kep., Ners., M.Kes selaku Rektor Universitas dr. Soebandi Jember
2. Ibu apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm. selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi Jember serta pembimbing Utama
3. Ibu apt. Dhina Ayu Susanti, S.Farm., M.Kes. selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember
4. Ibu apt. Dina Trianggaluh Fauziah, M.Farm selaku pembimbing Anggota
5. Bapak Sutrisno, S.ST., M.M. selaku dosen penguji skripsi

Penulis tentu menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Penulis mengharapkan kritik serta saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat. Akhir kata penulis mengucapkan terima kasih.

Jember, 13 April 2023

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN SKRIPSI	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
MOTTO	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1.Latar Belakang.....	1
1.2.Rumusan Masalah	5
1.3.Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1. Tujuan Umum	6
1.3.2. Tujuan Khusus	6
1.4.Manfaat Penelitian.....	7
1.5.Keaslian Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1.Kopi	9
2.2.Alkaloid	15
2.3.Senyawa Kafein.....	16
2.4.Tinjauan tentang Ekstraksi	18

2.5.High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	21
2.6.Validasi Metode.....	28
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL	33
3.1.Kerangka Konseptual	33
3.2.Hipotesis Penelitian	34
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....	35
4.1.Desain Penelitian	35
4.2.Populasi dan Sampel.....	35
4.3.Variabel Penelitian	35
4.4.Tempat Penelitian	36
4.5.Waktu Penelitian.....	36
4.6.Definisi Operasional	36
4.7.Teknik Pengumpulan data	39
4.8.Teknik Analisa Data	46
BAB 5 HASIL PENELITIAN	47
BAB 6 PEMBAHASAN	56
BAB 7 KESIMPULAN	65
DAFTAR PUSTAKA	66

DAFTAR TABEL

Tabel 1.5. Keaslian penelitian	7
Tabel 4.1. Definisi operasional validasi metode analisis	42
Tabel 5.1. Hasil pembuatan ekstrak kental	49
Tabel 5.2. Optimasi laju alir.....	50
Tabel 5.3. Penentuan fase gerak.....	50
Tabel 5.4. Uji kesesuaian sistem	53
Tabel 5.6.1. Selektivitas	53
Tabel 5.6.2. Linieritas	54
Tabel 5.6.3. LOD & LOQ	55
Tabel 5.6.4. Presisi	56
Tabel 5.6.5. Akurasi	57
Tabel 5.6.6. Penetapan kadar alkaloid	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Biji kopi.....	9
Gambar 2.2. Struktur kafein.....	15
Gambar 2.3. Sistem <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	27
Gambar 3.1. Kerangka konseptual	35
Gambar 5.3.1. Kromatogram panjang gelombang 272 nm.....	51
Gambar 5.3.2. Spektrum panjang gelombang 272 nm.....	52
Gambar 5.3.3. Isoplot 2D panjang gelombang 272 nm	52
Gambar 5.6.1. Kurva linieritas	54
Gambar 5.3.1. Kurva LOD & LOQ	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal penyusunan naskah skripsi	73
Lampiran 2. Surat hasil determinasi tanaman	74
Lampiran 3. <i>Certificate of Analysis Caffein</i>	75
Lampiran 4. Rendemen ekstrak etanol biji kopi robusta.....	76
Lampiran 5. Dokumentasi proses penyerbukan kopi robusta	78
Lampiran 6. Identifikasi senyawa alkaloid	81
Lampiran 7. Perhitungan pembuatan larutan baku kafein	82
Lampiran 8. Perhitungan linieritas, LOD & LOQ	83
Lampiran 9. Perhitungan presisi dan akurasi	84
Lampiran 10. Perhitungan validasi metode akurasi dan presisi.....	85
Lampiran 11. Perhitungan penetapan kadar alkaloid.....	87
Lampiran 12. Kromatogram dan data optimasi laju alir	89
Lampiran 13. Kromatogram dan data optimasi fase gerak	93
Lampiran 14. Kromatogram dan data validasi metode	96
Lampiran 15. Kromatogram dan data penetapan kadar alkaloid	136
Lampiran 16. Dokumentasi penelitian	139

DAFTAR SINGKATAN

HPLC	: <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
LOD	: <i>Limit of Detection</i>
LOQ	: <i>Limit of Quantitation</i>
SD	: Simpangan Deviasi
RSD	: Rata-rata Simpangan Deviasi
DAD	: <i>Diode-Array Detectors</i>
UKS	: Uji Kesesuaian Sistem
Ppm	: <i>Parts per million</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Pada tahun 2022, Indonesia menduduki peringkat ke empat dunia dalam pengembangan sektor industri kopi setelah brazil, columbia, dan vietnam. Salah satu industri yang berpotensi untuk dikembangkan dan berpengaruh dalam meningkatkan perekonomian adalah sektor perkebunan kopi. Dibandingkan dengan tanaman perkebunan lainnya, kopi ialah salah satu hasil perkebunan indonesia dengan tingkat yang relatif tinggi tingkat nilai ekonomi. Hal itu dikarenakan kopi cocok untuk ditanam didaerah dengan iklim subtropis dan tropis seperti Indonesia (Nurdiansyah *et al.*, 2017). Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia ialah salah satu industri produksi kopi yang terletak di Kecamatan Rambipuji, Kabupaten Jember, Jawa Timur. Selain mengembangkan kopi di daerah sekitar pusat penelitian ini memproduksi kopi untuk di ekspor (Puslitkoka, 2019).

Kopi ialah salah satu produk potensial di Indonesia. Produksi kopi di Indonesia mempunyai potensi yang strategis untuk dapat dikembangkan. Hal ini dilihat dari banyaknya orang yang menjadi penikmat kopi dikalangan anak muda hingga orang tua. Hal lain yang membuktikan adalah dengan melihat peran kopi di indonesia sebagai produsen keempat terbesar dunia. Kopi memiliki beberapa jenis diantaranya, yakni kopi arabika, kopi robusta, kopi liberika, serta kopi ekselsa. Jenis kopi yang paling dikenal dalam segi nilai ekonomis adalah kopi robusta dan kopi arabika (Juliantari *et al.*, 2018)

Fakta menarik tentang kopi adalah bahwa manfaat utamanya adalah meredakan kantuk dan kelelahan, yang diketahui sebagian besar orang. Hal ini disebabkan adanya kafein yang bisa merangsang sistem saraf pusat dan menaikkan konsentrasi (Rasyid *et al.*, 2017). Selain memiliki manfaat sebagai penghilang rasa kantuk, kopi juga memiliki manfaat sebagai antibakteri, antioksidan, antivirus, hepatoprotektif, dan juga berperan dalam aktivitas antispasmodik (Aida *et al.*, 2021). Selain itu kandungan senyawa yang terdapat pada kopi juga dapat memberikan efek farmakologi seperti antivirus hepatitis B, antihipertensi, antidiabetes, dan juga sebagai antioksidan dan hepatoprotektor yang digunakan sebagai alternatif dalam pengembangan obat baru (Farhaty & Muchtaridi, 2016).

Berdasarkan manfaat dari kopi yang dijelaskan diatas tidak terlepas dari adanya kandungan senyawa aktif dalam kopi robusta (*Coffea canephora*). Senyawa aktif yang terkandung dalam kopi meliputi senyawa alkaloid, tanin, saponin dan polifenol (Chairgulprasert & Kongsuwankeeree, 2017). Kafein merupakan turunan senyawa alkaloid utama golongan metilxantin. Senyawa alkaloid memiliki molekul yang secara alami terdapat dalam tumbuhan sebagai metabolit sekunder. Kafein pada manusia dapat digunakan sebagai stimulan pada jantung (Budiman *et al.*, 2015).

Ekstraksi ialah suatu cara pemisahan zat dari suatu campuran memakai pelarut yang sesuai. Setelah ekstraksi, sampel dipisahkan dari pelarut dengan penyaringan (Tetti, 2014). Ekstraksi yang paling sering digunakan pada penelitian kopi robusta adalah metode ekstraksi maserasi karena memiliki

beberapa keunggulan. Ekstraksi maserasi merupakan metode dengan proses yang sederhana memakai pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu kamar yaitu 25⁰C. Metode maserasi dipilih karena banyak keuntungannya, antara lain karena prosedur dan peralatannya tak memerlukan pemanasan sehingga bahan alami tak terurai. Selain itu, metode maserasi juga memiliki proses yang sederhana dan relatif cepat (Soemiati, 2013).

Beberapa ekstrak yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa tunggal tidak dapat menggunakan pemisahan tunggal sehingga diperlukan pembagian ekstrak menjadi fraksi-fraksi dengan polaritas dan molekul yang sama (Tetti, 2014). Pemisahan senyawa tunggal tersebut dapat dilakukan dengan ekstraksi cair-cair. Ekstraksi cair-cair yakni metode pemisahan yang banyak digunakan baik dalam skala laboratorium maupun dalam proses industri karena kesederhanaan, biaya rendah, kesesuaian untuk senyawa yang stabil secara termal dan titik didih tinggi, dan skalabilitas yang relatif yang mudah. Kondisi dan parameter yang dipilih dengan tepat seperti pelarut yang digunakan dalam ekstraksi, pH, dan suhu memberikan kemungkinan untuk mengumpulkan senyawa-senyawa yang dibutuhkan dan memisahkannya dari komponen yang tidak diinginkan dalam satu proses. Namun, peningkatan sistematis dari proses dengan memperkirakan efek dari berbagai modifikasi parameter adalah hal yang sulit dilakukan. Desain percobaan faktorial adalah pendekatan yang berguna, meskipun relatif memakan banyak tenaga kerja, untuk optimalisasi kondisi yang kompleks (Ahmadi *et al.*, 2015).

Ekstrak yang didapatkan dari hasil ekstraksi proses sebelumnya akan di analisis dan dilakukan penetapan kadar alkaloid dengan memakai metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Metode kajian lainnya yang biasa digunakan dalam penelitian biji kopi robusta adalah spektrofotometri UV-Vis dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Analisis menggunakan spektrofotometri mendapat hasil yang baik dengan hasil absorbansi sebesar 0,432 dan validasi pada parameter telah memenuhi persyaratan (Arikalang, 2018). Analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang pernah dilakukan mendapatkan hasil yang memenuhi persyaratan dengan rentang nilai Rf 0,72-0,77 pada *peak* yang muncul (Setyoningsih, 2019).

Pada studi ini dipakai metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) karena metode ini bisa memisahkan senyawa yang terkandung dalam kopi dengan selektif (Arwangga *et al.*, 2016). Menurut studi yang dilaksanakan (Sadegh-Zadeh, 2011), *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) memiliki keunggulan dalam segi pemisahan senyawa dan memiliki sensitivitas yang lebih baik dibandingkan spektrofotometri UV-Vis. Menurut penelitian yang dilakukan oleh (Amalia & Ulfah, 2015), *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) memiliki sensitivitas yang lebih baik dengan diperolehnya nilai P sebesar $0,02 < 0,05$ sehingga bisa menunjukkan hasil yang berbeda secara signifikan.

Berdasarkan uraian diatas studi ini dibuat guna mengetahui kadar kafein pada kopi robusta serta melakukan uji validasi memakai metode *High-*

Performance Liquid Chromatography (HPLC) pada senyawa golongan alkaloid. Peneliti memanfaatkan kopi robusta (*Coffea canephora*) yang didapat dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia di Jember, Jawa Timur sebagai sampel. Penetapan kadar alkaloid pada kopi robusta (*Coffea canephora*) dan uji validasi metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) mencakup analisis linieritas, selektivitas, limit deteksi, limit kuantitasi, akurasi serta presisi.

1.2.Rumusan Masalah

- 1) Bagaimana kondisi optimum *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang) pada sampel kopi robusta (*Coffea canephora*) di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia?
- 2) Bagaimana kondisi optimasi *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) yang terpilih sudah memenuhi persyaratan validasi guna melaksanakan penetapan kadar alkaloid pada sampel kopi robusta (*Coffea canephora*)?
- 3) Berapakah kadar alkaloid dalam produk kopi robusta (*Coffea canephora*) yang ditetapkan dengan metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) fase terbalik?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Studi ini bertujuan guna mengetahui validasi metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dapat digunakan untuk penetapan kadar alkaloid pada produk kopi robusta (*Coffea canephora*).

1.3.2. Tujuan Khusus

- 1) Untuk menentukan keadaan optimal untuk fase terbalik *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dalam sampel kopi robusta (*Coffea canephora*), melingkupi laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang.
- 2) Untuk memperoleh syarat parameter validasi meliputi linieritas, selektivitas, LOD, LOQ, akurasi, dan presisi pada metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) untuk melakukan penetapan kadar alkaloid pada sampel kopi robusta (*Coffea canephora*).
- 3) Untuk mengetahui kadar alkaloid dalam produk kopi robusta (*Coffea canephora*) yang ditetapkan dengan metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) fase terbalik.

1.4. Manfaat Penelitian

- 1) Studi ini berpotensi untuk menginformasikan kepada masyarakat tentang konsentrasi alkaloid, khususnya pada Kopi Robusta (*Coffea canephora*).
- 2) Secara teoritis, penelitian ini akan menambah bukti ilmiah untuk pengembangan metode analisis tervalidasi dan penentuan kadar alkaloid pada produk kopi Robusta (*Coffea canephora*), yang dapat menjadi kegiatan analisis rutin Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Kabupaten Jember.

1.5. Keaslian Penelitian

Judul Penelitian	Nama Peneliti	Persamaan	Perbedaan
Method Development and Validation for the Determination of Caffeine: An Alkaloid from <i>Coffea arabica</i> by High-performance Liquid Chromatography Method	Naveen <i>et al.</i> , 2018	a) Menggunakan metode HPLC b) Validasi metode HPLC c) Penetapan kadar alkaloid d) Menggunakan pelarut ekstrak etanol e) Menggunakan standar kafein	a) Menggunakan sampel kopi arabika b) Menggunakan metode ekstraksi sokletasi
Validasi Metode Analisis dan Penetapan Kadar Kafein menggunakan Metode KCKT Fase Terbalik pada Sampel Teh Hitam Dari PTPN XII Lawang Jawa Timur	Dyah, 2021	a) Menggunakan metode HPLC b) Validasi metode HPLC c) Menggunakan standar kafein	a) Menggunakan sampel teh hitam b) Menggunakan ekstraksi maserasi
New fluorescence spectroscopic method for the simultaneous determination of alkaloids in aqueous extract of green coffee beans	Yisak <i>et al.</i> , 2018	a) Menggunakan standar kafein b) Penetapan kadar alkaloid	a) Menggunakan metode spektroskopi fluoresensi baru b) Ekstrak air biji kopi hijau

Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis Pada Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (<i>Coffea Canephora</i>)	Rikza, 2022	a) Menggunakan sampel kopi robusta b) Menggunakan pelarut etanol c) Menggunakan metode ekstraksi maserasi	a) Menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis b) Penetapan kadar flavonoid total
--	-------------	---	---

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1.Kopi

2.1.1. Pengertian kopi

Kopi adalah salah satu jenis simplisia yang paling banyak dikembangkan karena mempunyai nilai ekonomis yang tinggi. Kopi yang paling umum dibudidayakan salah satunya yakni kopi robusta. Kopi Robusta mempunyai rasa yang tajam, sedikit asam serta kandungan kafein yang tinggi.

Kopi memiliki beberapa fungsi bagi tubuh. Fungsi yang paling sering dijumpai saat mengonsumsi kopi adalah kandungan kafein yang ada dalam kopi berguna untuk meningkatkan konsentrasi, bisa membuat tubuh merasa lebih segar dan hangat.

Secara taksonomi, klasifikasi kopi menurut (Virgiawan, 2021), adalah sebagai berikut:



Gambar 2.1 Biji Kopi
(Sumber: <https://iccri.net>)

Kingdom : Plantae

Sub kingdom : Angiospermae

Kelas : Dicotylidoneae

Sub kelas : Sympetalae
Famili : Rubiaceae
Ordo : Rubiales
Genus : Eucoffea
Spesies : *Coffea canephora*

Buah kopi robusta memiliki bentuk elips dengan rata-rata panjang buahnya 12 mm. Buah kopi robusta bisa dipanen selepas berusia 10-11 bulan. Kopi robusta memiliki rasa yang sedikit asam bahkan ada biji kopi robusta yang tidak memiliki rasa sama sekali sehingga sering disebut biji kopi kelas dua. Biji kopi robusta mengandung banyak golongan senyawa dan juga karakteristik yang dapat dilihat dari ciri khas morfologi pada setiap bagian tubuh dari biji kopi robusta. Morfologi dari biji kopi robusta terdapat dua biji kopi robusta dalam buah kopi dan biji kopi robusta berbentuk agak bulat, lengkungan bijinya lebih tebal serta memiliki garis tengah atas ke bawah hampir lurus (Virgiawan, 2021).

2.1.2. Klasifikasi kopi

Di indonesia bermacam jenis kopi yang dikembangkan oleh masyarakat yakni kopi arabika, kopi robusta, dan kopi liberika. Kopi liberika ialah pengembangan dari kopi arabika. Kopi yang paling sering dipilih untuk diperdagangkan adalah kopi arabika dan robusta sebab punya banyak peminat (Rizky & Saleh, 2016).

1) Kopi arabika

Kopi arabika ialah varietas kopi pertama yang dikembangkan di Indonesia, diikuti oleh Liberika dan Robusta. Kopi arabika biasanya tumbuh di ketinggian antara 1.000-2.100 meter di atas permukaan laut. Daerah budidaya kopi arabika memiliki dampak yang cukup besar terhadap cita rasa yang dihasilkan, sehingga perkebunan kopi arabika dibatasi pada daerah tertentu saja. Karakteristik dari biji kopi arabika pada umumnya punya bentuk yang agak memanjang dan lebih bercahaya dibandingkan dua jenis kopi lainnya (Rizky & Saleh, 2016).

2) Kopi robusta

Kopi Robusta mudah dibudidayakan karena dapat ditanam di dataran rendah dibandingkan kopi Arabika. Di Indonesia kopi jenis robusta punya lahan yang relatif luas dan juga kopi robusta dapat beradaptasi dengan lebih baik dibandingkan robusta. Karakteristik kopi robusta memiliki rendeman yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kopi arabika dan bentuk dari biji kopi robusta agak bulat (Rizky & Saleh, 2016).

3) Kopi liberika

Saat ini, kopi liberika sudah jarang ditanam di Indonesia karena beberapa faktor. Kopi liberika memiliki rendeman 10-12%. Bobot kering kopi liberika sekitar 10% dari bobot kopi

basah. Karena rendeman dari kopi liberika relatif rendah maka jenis kopi ini tidak pernah lagi dibudidayakan oleh perkebunan dan petani. Karakteristik dari kopi liberika ini hampir sama dengan jenis kopi arabika, hal ini dikarenakan jenis kopi liberika ialah pengembangan dari kopi arabika (Puslitkoka, 2019).

2.1.3. Manfaat kopi

Kopi punya bermacam manfaat untuk tubuh. Kopi bisa bermanfaat sebagai antioksidan, kandungan antioksidan pada kopi jika dibandingkan dengan teh maupun kopi memiliki kandungan yang lebih tinggi. Selain itu, kopi bisa merangsang konsentrasi otak dan kanker (Farida *et al.*, 2013).

Kopi dapat digunakan untuk mengurangi risiko diabetes dan asam urat, serta kadar asam urat dalam darah. Hal ini diakibatkan sebab adanya efek yang berkebalikan dari polifenol yang berfungsi untuk meningkatkan kadar enzim xanthin oksidase. Kopi juga memiliki manfaat sebagai antibakteri, antivirus, hepatoprotektif, dan berperan sebagai antispasmodik (Juliantari *et al.*, 2018).

Kopi dapat merangsang tubuh untuk melakukan berbagai kegiatan dan dapat menekan gangguan pernapasan apnea pada bayi prematur. Dalam kopi terdapat senyawa kafein yang termasuk ke dalam golongan alkaloid yang biasanya terdapat pada beberapa obat seperti pereda demam, sakit kepala dan nyeri karena bisa menaikkan daya kerja aspirin dan obat penghilang rasa sakit lainnya. Selain itu

dapat dimanfaatkan sebagai penyeimbang dorongan rasa kantuk yang dicampurkan ke dalam obat asma dan flu. Kafein juga bisa menstimulasi sistem saraf, sehingga bisa memperbaiki suasana hati dan meningkatkan konsentrasi (Oktadina *et al.*, 2013).

2.1.4. Kandungan kopi

Berdasarkan uraian manfaat kopi diatas tidak terlepas karena adanya kandungan senyawa pada kopi yang berperan didalamnya. Senyawa kimia yang terdapat pada kopi menurut (Rizky & Saleh, 2016), antara lain kafein, asam klorogenat, trinogelin, lemak, asam amino, asam organik, asam volatil, dan mineral yang dapat memberikan manfaat ataupun bahaya bagi tubuh jika dikonsumsi secara berlebihan.

Senyawa kimia lainnya yang terdapat pada kopi antara lain golongan flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid, dan saponin. Senyawa kimia tersebut memberikan efek antioksidan dan antibakteri. Golongan alkaloid yang paling tinggi dalam kopi adalah kafein (Nada & Rahayu, 2021).

1) Flavonoid

Flavonoid dalam kopi dapat dilihat dengan adanya perubahan warna karena terjadinya reduksi oleh asam klorida dan magnesium.

2) Alkaloid

Adanya alkaloid dalam kopi ditandai dengan adanya penggantian ligan nitrogen. Hal ini dikarenakan alkaloid mempunyai pasangan elektron bebas yang menggantikan ion iodo.

3) Tanin

Sifat yang dimiliki tanin adalah dapat mengendapkan protein saat diberi penambahan dengan pereaksi. Tanin yang terdapat pada kopi merupakan tanin terkondensasi.

4) Terpenoid

Gugus senyawa terpenoid atau steroid, yang terbentuk lewat pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi, dioksidasi menjadi terpenoid dalam kopi.

5) Saponin

Senyawa saponin pada umumnya berbentuk glikosida sehingga memiliki kemampuan dalam pembentukan buih dalam air.

6) Asam klorogenat

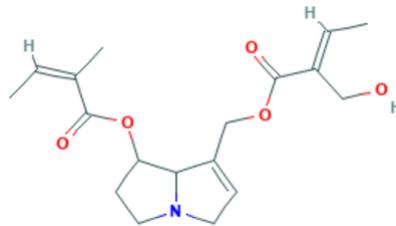
Manfaat adanya senyawa asam klorogenat dalam kopi adalah sebagai antioksidan, antivirus, hepatoprotektif, dan dapat berperan dalam antispasmodik.

7) Kafein

Kafein ialah senyawa terbanyak yang ada pada kopi. Kafein memiliki banyak manfaat sebagai stimulan yang dapat memberikan energi, mengurangi kelelahan dan dapat

meningkatkan kinerja motorik sehingga dapat membantu mempertahankan konsentrasi.

2.2. Alkaloid



Gambar 2.2 Struktur Alkaloid
Sumber: PubChem

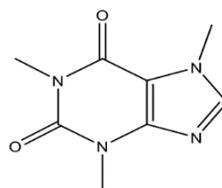
Alkaloid ialah senyawa yang strukturnya banyak dijumpai dalam berbagai tanaman. Alkaloid mengandung atom nitrogen. Umumnya senyawa alkaloid memiliki rasa pahit. Beberapa alkaloid, seperti nikotin dan konin, berbentuk cairan. Mayoritas alkaloid ada sebagai padatan kristal dengan kualitas amorf kecil. Alkaloid biasanya tidak berwarna dan larut dalam pelarut organik, meskipun beberapa larut dalam air. Titik didih dari alkaloid berkisar 87-238°C. Alkaloid pada umumnya mempunyai satu atom N (Hammado, 2013).

Senyawa golongan alkaloid pada kopi terdiri dari tiga senyawa yang sama yaitu kafein, *theophylline*, *theobromine*. Dapat dikatakan senyawa yang sama karena *theophylline* dan *theobromine* adalah bagian lain dari senyawa kafein yang terkandung dalam kopi. Diantara ketiga senyawa tersebut, kafein adalah senyawa paling tinggi yang terdapat pada kopi. Khasiat yang ada pada kopi sebagian besar dikarenakan adanya senyawa kafein (Naveen *et al.*, 2018b).

2.3.Senyawa Kafein

2.3.1. Struktur kafein

Kafein memiliki nama kimia 1,3,7-Trimethylxanthina dengan rumus kimia $C_8H_{10}N_4O_2$. Kafein punya berat molekul sebesar 194,19 g/mol. Kafein memiliki nama IUPAC sesuai PubChem yaitu 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione,3,7-dihydro-1,3,7trimethyl-1H-purine-2,6-dione (Indonesia, 2014).



Gambar 2.3 Struktur Kafein
Sumber: PubChem

2.3.2. Sifat fisika kimia kafein

Kafein merupakan salah satu turunan dari golongan alkaloid yang termasuk kedalam derivat xantin. Kafein adalah zat putih dengan bentuk jarum yang dipoles, tidak berbau, rasa tajam, dan netralitas kertas lakmus. Kafein sukar larut dalam air, etanol, dan eter, mudah larut dalam kloroform.

Titik didih kafein berada pada suhu 178°C dengan titik leleh 234°C . Sedangkan untuk titik lebur dari kafein adalah 235°C serta 275°C . Dosis maksimum kafein ialah 500 mg buat sekali pemakaian

serta dosis harian maksimum adalah 1,5 gram. Kafein harus disimpan dalam wadah yang tertutup (Indonesia, 2014).

2.3.3. Mekanisme kerja kafein

Kafein memiliki kemampuan memberikan sinyal pada otak untuk merespon dan mengolah memori agar lebih cepat merespon. Kerja kafein adalah dengan merangsang saraf pusat, sistem pembuluh darah dan jantung, juga pada sistem pernapasan. Karena kinerja dari kafein itu maka dapat memberikan efek segar dan mudah berkonsentrasi serta tidak mudah mengantuk (Septiningtyas *et al.*, 2018).

2.4. Tinjauan tentang Ekstraksi

Ekstraksi ialah pemisahan senyawa dari suatu campuran memakai pelarut yang mampu mengekstraksi tanpa melarutkan senyawa yang diinginkan. Pemisahan suatu zat berdasarkan berbagai sifatnya ialah proses ekstraksi. Air dan pelarut organik paling umum biasanya dipakai dalam ekstraksi, dengan pelarut yang dipilih berdasarkan sifat kelarutan senyawa dalam bahan yang akan diekstraksi (Chairgulprasert & Kongsuwankeeree, 2017).

Ekstraksi bertujuan untuk menghilangkan senyawa kimia dari bahan yang diekstraksi. Pada umumnya senyawa antimikroba dan antioksidan diekstrak menggunakan pelarut untuk mengetahui adanya senyawa penyusun aktif (Tedder, 2013).

Ekstraksi mempunyai dua golongan yakni ekstraksi padat-cair serta ekstraksi cair-cair. Ekstraksi padat-cair dipakai guna memisahkan senyawa dalam bentuk cair, sedangkan ekstraksi cair-cair dipakai guna memisahkan senyawa padat yang terlarut dalam suatu pelarut (Tedder, 2013). Terdapat beberapa metode dalam golongan tersebut, sebagai berikut:

1) Ekstraksi padat-cair

Leaching atau ekstraksi padat-cair ialah teknik pemisahan satu atau lebih komponen (zat terlarut) dari campuran zat yang tak larut (inert) dengan memakai cairan pelarut (solvent) (Treybal, 1980). Pemisahan dapat terjadi bila ada gaya dorong, seperti perbedaan konsentrasi zat terlarut dalam padatan dan konsentrasi zat terlarut dalam pelarut, serta perbedaan kelarutan komponen dalam mélange.

1. Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi langsung dimana simplisia direndam dalam satu atau campuran pelarut pada suhu kamar dan tanpa cahaya selama waktu yang telah ditentukan. Waktu maserasi harus diperhatikan selama ekstraksi; semakin lama waktu maserasi, semakin lama pelarut akan meningkatkan jumlah sel yang retak dan konstituen aktif yang terlarut (Wahyuni & Widjanarko, 2015).

Keuntungan dari ekstraksi maserasi adalah memastikan keutuhan bahan aktif yang diekstraksi (Chairunnisa *et al.*, 2019). Menurut (Budiman *et al.*, 2015), keuntungan dari teknik maserasi antara lain

tidak adanya panas sehingga mencegah terjadinya dekomposisi bahan alam yang ada.

2. Perkolasi

Perkolasi adalah metode ekstraksi dingin senyawa aktif dengan cara mengalirkan pelarut secara terus menerus di atas simplisia selama jangka waktu yang telah ditentukan (Wahyuni & Widjanarko, 2015).

3. Refluks

Ekstraksi refluks ialah metode ekstraksi yang dilaksanakan dengan adanya pendingin balik (kondensor) dalam kurun waktu tertentu dan pelarutan pada titik didih. Pada rafinat pertama, umumnya dilaksanakan tiga sampai lima kali. Ekstraksi refluks punya kelebihan bisa mengekstraksi bahan dengan tekstur kasar dan tahan terhadap pemanasan langsung. Kelemahan dari prosedur ini yakni memakai banyak pelarut.

4. Sokletasi

Ekstraksi sokletasi ialah metode ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, ekstraksi ini memakai alat khusus dengan adanya pendingin balik (kondensor). Teknik ini melibatkan penyimpanan padatan dalam soket, memanaskan dan kemudian mendinginkan pelarut dalam kondensor, lalu mengekstraksi padatan. Metode sokletasi ini memiliki kelebihan yaitu prosesnya berlangsung secara berkelanjutan dan metode yang membutuhkan lebih sedikit

waktu dan pelarut daripada maserasi atau perkolas. Kelemahan metode ini yakni bisa merusak padatan atau zat lain yang tak tahan panas, hal ini dikarenakan sokletasi akan melakukan pemanasan pada ekstrak secara terus menerus (Soemiati, 2013).

2) Ekstraksi cair-cair

Dalam ekstraksi cair-cair, pelarut dipakai guna memisahkan satu atau lebih komponen campuran. Ketika distilasi tak bisa dipakai guna memisahkan campuran (misalnya, sebab pembentukan azeotrop atau kepekaan campuran terhadap panas) atau ketika tak hemat biaya, ekstraksi cair-cair biasanya digunakan. Ekstraksi cair-cair tersusun atas setidaknya dua langkah, termasuk pencampuran intensif ekstraktan dengan pelarut dan pemisahan dua fase cair semaksimal mungkin. Dalam ekstraksi cair-cair, pelarut cair digunakan untuk memisahkan analit dari cairan pembawa (diluen). Campuran cairan pembawa dan pelarut ini heterogen; ketika dipisahkan, itu terdiri dari dua fase: fase pengencer (raffinate) dan fase pelarut (ekstrak) (Ahmadi *et al.*, 2015).

Pemilihan pelarut dalam ekstraksi cair-cair disesuaikan dengan sampel yang akan digunakan. Pelarut yang sesuai akan menghasilkan sampel yang maksimal. Senyawa polar hanya larut pada senyawa polar, sedangkan senyawa non polar akan larut dalam pelarut non polar. Contoh pelarut polar adalah etanol, metanol, butanol, dan air, sedangkan contoh pelarut non polar meliputi n-Heksan dan kloroform (Ahmadi *et al.*, 2015).

2.4.1. Tinjauan tentang ekstrak

Ekstrak ialah sediaan pekat yang dihasilkan dari proses ekstraksi dengan memakai pelarut yang sesuai. Ekstrak adalah suatu zat aktif yang diperoleh dari penguapan campuran solute dan solvent. Pelarut yang biasanya digunakan untuk menghasilkan ekstrak adalah air dan pelarut organik (Juliantari *et al.*, 2018).

2.5. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) pertama kali dikembangkan sebagai teknik analisis pada awal abad ke-20 dan pertama kali digunakan sebagai metode guna pemisahan senyawa berwarna. Nama kromatografi didapatkan saat pengembangan metode. Kromatografi berasal dari kata *chroma* yang berarti pigmen dan *graph* yang berarti tulisan. Ahli botani rusia bernama Mikhail S. Tswett menggunakan bentuk pemisahan kromatografi yang belum sempurna untuk memurnikan campuran pigmen tumbuhan menjadi konstituen murni. *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ialah metode kimia analitik yang dipakai guna pemisahan, identifikasi, dan kuantifikasi setiap komponen dalam suatu campuran (Sabir Azim *et al.*, 2013).

2.5.1. Prinsip kerja

Prinsipnya adalah bahwa larutan sampel diinjeksikan ke dalam kolom bahan berpori (fase diam) dan cairan (fase gerak) dipompa pada tekanan tinggi melalui kolom. Pemisahan sampel didasarkan pada perbedaan laju migrasi melalui kolom yang timbul

dari partisi sampel yang berbeda antara fase diam dan fase gerak. Tergantung pada perilaku partisi komponen yang berbeda, elusi pada waktu yang berbeda terjadi. Senyawa sampel dengan afinitas yang lebih besar ke lapisan stasioner akan bergerak lebih lambat dan untuk jarak yang lebih pendek dibandingkan dengan senyawa dengan afinitas kurang yang bergerak lebih cepat dan guna jarak yang lebih jauh (Sabir Azim *et al.*, 2013).

Umumnya, detektor yang terpasang pada unit *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) menghasilkan sinar ultraviolet dengan panjang gelombang yang ditentukan secara khusus dan sampel yang dielusi dikenai sinar ultraviolet ini. Molekul-molekul spesies yang dielusi menjadi tereksitasi dengan menyerap energi sinar ultraviolet, selama proses energi de-eksitasi dilepaskan yang sedang direkam oleh detektor (Susanti *et al.*, 2019).

Sinyal yang sesuai dengan perubahan energi dihasilkan dan direkam dalam bentuk grafik yang disebut kromatogram. Penyerapan dari sinar ultraviolet tergantung pada gugus fungsional spesies yang dielusi, karena setiap gugus fungsional membutuhkan jumlah energi tertentu untuk eksitasi, yang dibawa oleh sinar ultraviolet dengan panjang gelombang tertentu. Namun, terkadang secara khusus dilaporkan mahal peralatan sering tidak tersedia di laboratorium penelitian. Untuk mencapai analisis yang diinginkan pada set peralatan yang tersedia, parameter tertentu perlu disetel, ini

disebut pengembangan metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Tujuan utama dari uraian ini adalah untuk menjelaskan instrumentasi metode semua parameter yang mempengaruhi hasil *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan merangkum prosedur validasi metode yang dikembangkan (Sabir Azim *et al.*, 2013).

2.5.2. Jenis *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) memiliki berbagai macam jenis dengan fase yang berbeda-beda, sebagai berikut:

1) Kromatografi Fase normal

Metode kromatografi jenis ini digunakan untuk memisahkan analit berdasarkan polaritas dengan memakai fase diam yang bersifat polar dan fase gerak yang bersifat non polar. Fase diam yang biasanya dipakai dalam metode ini adalah silika, sedangkan fase gerak yang dipakai yakni heksana, metilen klorida, kloroform, dan dietil eter. Dengan ketentuan tersebut sampel polar dipertahankan pada permukaan polar dalam kolom lebih lama dibandingkan dengan bahan yang kurang polar (Aulia & Muchtaridi, 2016).

2) Kromatografi fase terbalik

HPLC fase terbalik (RP-HPLC atau RPC) punya fase diam non-polar dan fase gerak berair yang cukup polar. RPC beroperasi

pada prinsip interaksi hidrofobik, yang dihasilkan dari gaya tolak-menolak antara eluen polar, analit yang relatif non-polar, dan fase diam non-polar. Pengikatan analit ke fase diam sebanding dengan luas permukaan kontak di sekitar komponen non-polar dari molekul analit setelah dikaitkan dengan ligan dalam eluen berair (Kuncoro, 2017).

3) Kromatografi pertukaran ion

Dalam kromatografi pertukaran ion, kemampuan mempertahankan retensi dilandaskan pada daya tarik antara ion-ion terlarut dan zat-zat bermuatan yang terikat pada fase stasioner. Ion-ion dengan muatan yang sama dikeluarkan. Bentuk kromatografi ini banyak dipakai pada memurnikan air, Kromatografi pertukaran ligan, Kromatografi penukar ion protein, kromatografi penukar anion pH tinggi karbohidrat dan oligosakarida, dll (Gallant *et al.*, 1996).

4) Kromatografi eksklusi ukuran

Kromatografi eksklusi ukuran (SEC), juga disebut sebagai kromatografi permeasi gel atau kromatografi filtrasi gel terutama memisahkan partikel berdasarkan ukuran. Teknik ini juga berfungsi guna menetapkan struktur tersier dan struktur kuarterner protein dan asam amino. Teknik ini banyak dipakai guna penetapan berat molekul polisakarida (Oeyen *et al.*, 2018).

5) Kromatografi bio-afinitas

Pemisahan berdasarkan interaksi reversibel spesifik protein dengan ligan. Ligan secara kovalen melekat pada penyangga padat pada matriks bioafinitas, mempertahankan protein dengan interaksi pada ligan yang terikat pada kolom. Protein yang terikat pada kolom bioafinitas dapat dielusi dengan dua cara:

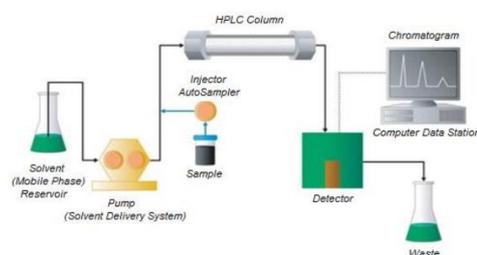
Elusi biospesifik: penyertaan ligan bebas dalam buffer elusi yang berkompetisi dengan ligan yang terikat pada kolom.

Elusi spesifik: perubahan pH, garam, dll. Yang melemahkan interaksi protein dengan substrat yang terikat kolom.

Karena spesifisitas interaksi, kromatografi bioafinitas dapat menghasilkan pemurnian yang sangat tinggi dalam satu langkah (10 - 1000 kali lipat) (El *et al.*, 2020).

2.5.3. Instrumen *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Komponen terpenting dari instrumen *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah: fase diam atau fase gerak, sistem pengantaran pelarut, perangkat pengantar sampel, kolom, detektor, pengumpulan data dan output (Sabir Azim *et al.*, 2013).



Gambar 2.2 Sistem *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC)
Sumber: (Wiese *et al.*, 2011)

1) Fase diam dan fase gerak

Tempat penampungan yang menampung fase gerak sering kali hanya berupa botol kaca. Seringkali, botol reagen yang menampung pelarut *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) bisa dipakai sebagai tempat penampungan. Pelarut dialirkan dari penampungan ke pompa melalui pipa Teflon yang disebut saluran masuk ke pompa. Beberapa sistem *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) seperti Agilent 1100 yang ditunjukkan di sebelah kanan memiliki kompartemen khusus untuk menampung satu atau lebih penampung fase gerak. Penampung dalam sistem ini mungkin memiliki fitur tambahan yang memungkinkan fase gerak menjadi degassed dan terisolasi dari kontak dengan udara.

2) Pelarut

Sistem pengiriman pelarut digambarkan seperti sistem pengiriman aliran bebas fase gerak ke *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) terlepas dari tekanan balik sistem.

3) Sampel

Injeksi sampel pada tekanan atmosfer ke dalam sistem, pada tekanan tinggi, merupakan langkah penting dalam proses kromatografi. Katup injeksi sampel, atau katup pengalih, digunakan untuk memasukkan jumlah sampel yang dapat direproduksi ke dalam aliran eluen *High-Performance Liquid*

Chromatography (HPLC) tanpa menyebabkan perubahan tekanan atau aliran.

4) Kolom

Kolom adalah jantung dari sistem *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC), Ada beberapa jenis matriks untuk mendukung fase diam, termasuk silika, polimer, dan alumina. Silika adalah matriks yang paling umum untuk kolom *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Matriks silika kuat, mudah diderivatisasi, diproduksi untuk ukuran bola yang konsisten, dan tidak cenderung memampatkan di bawah tekanan. Silika secara kimiawi stabil untuk sebagian besar pelarut organik dan pH rendah sistem.

5) Detektor

Gambaran umum berbagai detektor *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) disediakan dengan deskripsi karakteristik detektor yang unik dan perbandingan kelebihan dan kekurangan di antara detektor-detektor tersebut. Fokus diberikan pada detektor yang paling umum, termasuk absorbansi UV/Vis, fluoresensi, elektrokimia, konduktivitas, indeks refraksi, dan detektor spektrometri massa.

6) Pengumpulan data dan output

Output dicatat sebagai serangkaian puncak, masing-masing mewakili senyawa dalam campuran yang melewati detektor dan

menyerap Sinar UV (dalam hal HPLC-UV/Vis). Area di bawah puncak sebanding dengan jumlah zat, yang dilewatkan detektor, dan area ini bisa dihitung secara otomatis oleh komputer yang terhubung ke layar.

2.6. Validasi Metode

Validasi ialah proses mendemonstrasikan lewat studi laboratorium kalau karakteristik kinerja suatu prosedur memenuhi spesifikasi untuk tujuan penggunaannya. Proses validasi metode guna prosedur analitis dimulai dengan perolehan data validasi yang terencana dan sistematis. Semua metode analisis yang dimaksudkan digunakan untuk menganalisis sampel klinis apapun yang perlu divalidasi. validasi metode analisis dilakukan sesuai pedoman ICH.

Validasi metode analisis merupakan suatu prosedur untuk melakukan pembuktian bahwa pendekatan, proses, strategi, laboratorium, instrumen, pereaksi, kondisi ruangan, dan prosedur eksperimental yang telah dipilih dapat digunakan dengan cara yang konsisten serta tepat dalam serangkaian kondisi yang tetap. Validasi metode analisis ialah proses mendemonstrasikan karakteristik metode relatif terhadap jenis analisis yang dipilih (Naveen *et al.*, 2018a).

Parameter dalam validasi metode analisis memiliki beberapa karakteristik yang perlu dibuktikan, seperti akurasi, presisi, linieritas, batas deteksi, batas kuantifikasi serta uji kesesuaian sistem. Parameter-parameter ini

menjamin bahwa analisis dapat dilanjutkan ke tahap pengujian dengan tujuan menghasilkan hasil yang valid (Sabir Azim *et al.*, 2013).

1) Selektivitas

Selektivitas ialah kemahiran untuk menganalisis analit secara selektif dengan adanya komponen yang diharapkan muncul saat analisis. Selektivitas digunakan untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya kotoran, degradasi, matriks dan komponen lainnya dalam sampel yang akan dianalisis. Dalam prosedur perlakuan untuk menilai selektivitas dilakukan uji kemurnian. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa identitas analit yang didapat terhindar dari kandungan pengotor seperti zat logam maupun kandungan sisa pelarut (AOAC, 2013).

Spesifisitas adalah kapasitas untuk mengevaluasi analit secara tegas dengan adanya komponen yang diharapkan. Biasanya ini mungkin termasuk kotoran, degradasi, matriks, dll. Kurangnya spesifisitas prosedur individu dapat dibandingkan dengan prosedur analisis pendukung lainnya. Sehubungan dengan identifikasi, perbedaan antara senyawa yang terkait erat yang mungkin ada harus ditunjukkan oleh sampel positif dan negatif. Dalam kasus uji kromatografi dan uji pengotor, pengotor / pengurai yang tersedia dapat diinjeksikan pada tingkat yang sesuai dengan matriks yang sesuai atau sampel yang terurai dapat digunakan. Untuk pengujian, dapat dibuktikan bahwa hasilnya tidak terpengaruh oleh bahan yang digunakan. Kotoran harus dipisahkan secara tersendiri dari komponen matriks lainnya. Spesifisitas juga dapat

dibuktikan dengan verifikasi hasil dengan prosedur analisis independen. Dalam kasus pemisahan kromatografi, faktor resolusi harus diperoleh untuk pemisahan kritis. Tes untuk homogenitas puncak yang direkomendasikan, misalnya, dengan menggunakan metode deteksi bydiode array (DAD) atau spektrometri massa (MS) (Sabir Azim *et al.*, 2013).

2) Akurasi

Akurasi merupakan suatu metode penambahan standar, dimana sampel ditambahkan dengan jumlah analit yang diketahui untuk digunakan sebagai penentuan akurasi. Akurasi didefinisikan sebagai kesesuaian antara hasil tes dalam rentang tertentu dan nilai referensi yang diterima. Akurasi akan mendapatkan hasil berupa nilai standar deviasi (Eserian & Lombardo, 2015).

Akurasi dalam prosedur analisis menyatakan keakuratan kesesuaian antara nilai yang diterima baik sebagai nilai sebenarnya yang konvensional atau nilai referensi yang diterima dan nilai yang diperoleh. Akurasi dapat ditunjukkan dengan pendekatan sebagai berikut:

- 1) Dapat disimpulkan dari presisi, linearitas dan spesifisitas.
- 2) Perbandingan hasil dengan hasil dari prosedur yang dikarakterisasi dengan baik.
- 3) Prosedur independen
- 4) Penerapan pada bahan referensi (untuk zat obat)

- 5) Pemulihan zat obat yang dibubuhi plasebo atau produk obat (untuk produk obat).
- 6) Pemulihan pengotor yang dibubuhi zat obat atau produk obat (untuk pengotor).

Untuk pendekatan kuantitatif, setidaknya sembilan penentuan di seluruh rentang yang ditentukan harus diperoleh, misalnya, tiga pengulangan pada tiga tingkat konsentrasi masing-masing. Direkomendasikan adalah persentase pemulihan atau perbedaan antara mean dan nilai aktual yang diterima, bersama dengan selang kepercayaan (Eserian & Lombardo, 2015).

3) Presisi

Presisi adalah kesesuaian (tingkat dispersi) antara serangkaian pengukuran yang didapat dari bermacam pengambilan sampel dari sampel homogen yang sama dalam kondisi tertentu. Ada tiga tingkat presisi: keterulangan, presisi menengah, dan reproduktifitas.

Presisi membutuhkan penggunaan sampel asli. Untuk setiap tingkat presisi, parameter standar deviasi, standar deviasi relatif (koefisien variasi), dan selang kepercayaan harus dihitung. Setidaknya sembilan penentuan dalam kisaran yang ditentukan atau enam penentuan pada konsentrasi uji 100 persen diperlukan (Naveen *et al.*, 2018a).

4) Batas deteksi (LOD) & Batas kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi prosedur analitik yang diberikan yakni jumlah analit terkecil yang bisa dideteksi dalam sampel yang tak dapat diukur

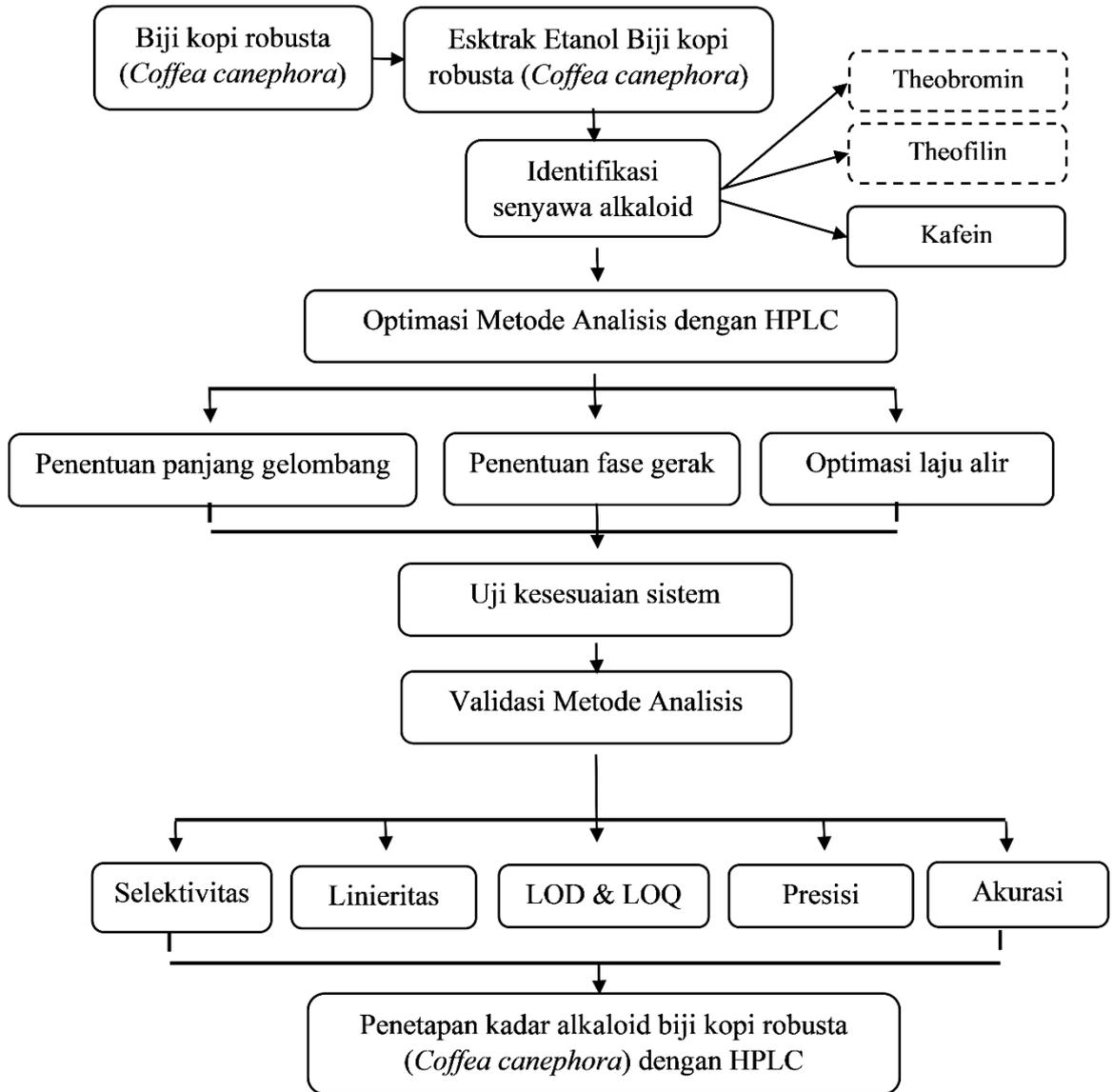
secara tepat. Batas kuantitasi dari prosedur analitik individu ialah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang bisa ditetapkan secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang memadai. Batas yang diperkirakan harus dibuktikan dengan mengkaji sejumlah sampel yang sesuai yang mengandung analit pada konsentrasi yang sesuai, DL atau QL dan prosedur yang digunakan untuk penentuan, serta kromatogram rele-vant, harus dilaporkan (Naveen *et al.*, 2018a).

5) Linieritas

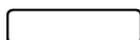
Linearitas prosedur analitik adalah kapasitasnya, dalam rentang tertentu, guna menghasilkan hasil uji yang berbanding lurus dengan konsentrasi (jumlah) analit dalam sampel. Ini dapat ditunjukkan langsung pada analit, atau pada sampel beraspek menggunakan setidaknya lima konsentrasi di seluruh rentang kerja, selain evaluasi visual dari sinyal analit sebagai fungsi dari konsentrasi, perhitungan statistik yang sesuai direkomendasikan, seperti regresi linier. Parameter kemiringan dan intersep, jumlah sisa kuadrat dan koefisien korelasi harus dilaporkan. Presentasi grafis dari data dan residual direkomendasikan (Naveen *et al.*, 2018a).

BAB 3 KERANGKA KONSEP

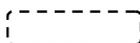
3.1. Kerangka konseptual



Keterangan :



= diteliti



= tidak diteliti

Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

3.2.Hipotesis penelitian

Hipotesis penelitian ini ialah optimasi dan validasi metode analisis akan menunjukkan kalau parameter validitas metode analisis *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) memenuhi persyaratan parameter validasi dan bisa diaplikasikan pada kandungan alkaloid kopi robusta (*Coffea canephora*) ekstrak.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1.Desain penelitian

Desain studi ini menggunakan studi eksperimental laboratorium sebagai rancangannya. Validasi Metode Analisis *High Performance Liquid Chromatophy* (HPLC) Untuk Penentuan Konsentrasi Alkaloid Pada Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) menjadi pokok bahasan studi.

4.2.Populasi dan Sampel

4.2.1. Populasi

Kopi robusta (*Coffea canephora*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari pusat penelitian kopi dan kakao di Jember.

4.2.2. Sampel penelitian

Sampel yang dipakai dalam studi ini yakni biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang diperoleh dari pusat penelitian kopi dan kakao di Jember.

4.3.Variabel penelitian

1) Variabel bebas (Independent variable)

Pada studi ini variabel bebasnya yakni ekstrak etanol kopi robusta (*Coffea canephora*).

2) Variabel terikat (Dependent variable)

Dalam studi ini variabel terikatnya ialah parameter validasi metode analisis dan kandungan alkaloid ekstrak etanol kopi robusta (*Coffea canephora*).

4.4.Tempat penelitian

Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember merupakan tempat pengambilan sampel. Universitas dr. Soebandi adalah tempat melakukan penelitian. Ekstraksi maserasi atau pengolahan sampel biji kopi Robusta (*Coffea canephora*) untuk menghasilkan ekstrak kental di Laboratorium Biologi Universitas. Selain itu, penelitian yang memanfaatkan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas dr. Soebandi guna melakukan proses ekstraksi cair-cair kemudian memanfaatkan Laboratorium Instrumen Universitas dr. Soebandi untuk mengoptimalkan dan memvalidasi metode analisis.

4.5.Waktu penelitian

Penelitian ini dimulai pada Februari hingga bulan Maret 2023.

4.6.Definisi operasional

- 4.6.1. Sampel kopi robusta berbentuk bubuk yang diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember, Jawa Timur.
- 4.6.2. Instrumen *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merek Agilent yang digunakan dalam studi ini memakai fase diam kolom

poroshell 120 EC C-18 dan sintesis fase gerak 80:5:15 asetonitril:metanol:aquaabidestilata dengan laju alir 1,4 mL/menit.

4.6.3. Konsentrasi alkaloid diukur dalam satuan ppm (*parts per million*)

4.6.4. Tabel 4.1 Definisi Operasional Validasi Metode Analisis

No	Nama Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel terikat (Dependent variable)						
1.	Linieritas	Linieritas adalah kemampuan prosedur analitik untuk memperoleh respon yang berbanding lurus dengan konsentrasi (jumlah) analit dalam sampel (Sabir Azim <i>et al.</i> , 2013).	HPLC	Dengan memplot area yang diperoleh dengan konsentrasi analit dan menghitung nilai r, linieritas dapat diukur.	“Satuan hasil ukur linieritas dinyatakan dalam nilai r”	<i>Ratio</i>
2.	Batas Deteksi	Batas deteksi dari suatu prosedur individu adalah jumlah analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi tetapi tidak harus dikuantifikasi sebagai nilai yang tepat (Sabir Azim <i>et al.</i> , 2013).	HPLC	Batas deteksi ditentukan dengan membagi konsentrasi yang diberikan pada rasio signal-to-noise dengan area yang diukur untuk menentukan batas deteksi.	“Satuan hasil ukur batas deteksi dinyatakan dalam ppm”	<i>Ratio</i>
3.	Batas Kuantitasi	Batas kuantitasi adalah jumlah analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan presisi	HPLC	Mengukur konsentrasi yang diberikan pada rasio signal-to-noise dibagi dengan area yang diukur menghasilkan batas deteksi.	“Satuan hasil ukur batas deteksi dinyatakan dalam ppm”	<i>Ratio</i>

		dan akurasi yang sesuai (Sabir Azim <i>et al.</i> , 2013).				
4.	Selektivitas	Selektivitas adalah kemampuan untuk menilai analit dengan jelas dengan adanya komponen yang mungkin diharapkan ada seperti pengotor, produk degradasi, dan eksipien (Sabir Azim <i>et al.</i> , 2013).	HPLC	Cara ukur selektivitas yaitu dengan cara membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung pengotor, produk degradasi, dan eksipien.	Satuan hasil ukur batas deteksi dinyatakan dalam Rs	<i>Ratio</i>
5.	Akurasi	Akurasi adalah kedekatan nilai terukur dengan nilai yang benar atau diterima. akurasi menunjukkan penyimpangan antara nilai rata-rata yang ditemukan dan nilai sebenarnya (Sabir Azim <i>et al.</i> , 2013).	HPLC	Cara ukur akurasi yaitu dengan cara membagi hasil konsentrasi analit yang didapat dengan konsentrasi analit yang sebenarnya.	Satuan hasil ukur batas deteksi dinyatakan dalam %	<i>Ratio</i>
6.	Presisi	Presisi suatu metode analitik adalah tingkat kesepakatan di antara hasil uji individu yang diperoleh ketika metode tersebut diterapkan pada pengambilan sampel berganda dari sampel yang	HPLC	Cara ukur presisi yaitu dengan cara mengukur presisi melibatkan rata-rata luas yang diperoleh dan menghitung nilai RSD.	Satuan hasil ukur batas deteksi dinyatakan dalam %	<i>Ratio</i>

homogen
(Sabir Azim *et al.*, 2013).

Variabel bebas (Independent variable)						
7.	Kadar	Kadar merupakan penetapan jumlah kandungan senyawa total yang terdapat dalam ekstrak etanol biji kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>) (Ilmiana, 2022)	Perhitungan kadar = $\frac{C \times V \times Fp}{W}$ Keterangan: C = Konsentrasi senyawa dalam larutan sampel ($\mu\text{g/ml}$) V = Volume larutan sampel (ml) Fp = Faktor pengenceran W = Berat sampel (g)	Cara ukur kadar yaitu dengan cara menggunakan nilai persamaan regresi linear lalu dimasukkan kedalam rumus perhitungan.	“Satuan hasil ukur kadar dinyatakan dalam $\mu\text{g/ml}$ ”.	<i>Ratio</i>

4.7. Teknik pengumpulan data

4.7.1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilaksanakan untuk mencegah kesalahan pengambilan sampel bahan penelitian dan untuk memastikan benih yang digunakan dalam penelitian adalah benih Robusta yang asli. Penentuan simplisia dilaksanakan di Politeknik Negeri Jember.

4.7.2. Pembuatan ekstrak

Metode yang dipakai dalam pembuatan ekstrak biji kopi robusta adalah metode ekstraksi maserasi. Perbandingan yang dipakai dalam pembuatan ekstrak yakni 1:10, dengan uraian 200 gram serbuk biji kopi banding 2000 mL etanol 96%. Prosesnya memakan waktu 7 hari, dan setiap hari selama 5 menit campuran

diaduk. Hasil yang didapatkan dari ekstraksi kemudian dipekatkan dengan memakai vacuum rotary evaporator pada suhu 50⁰C dengan tujuan guna menguapkan pelarut yang tersisa pada ekstrak sekaligus memekatkan ekstrak (Wardani & Fernanda, 2016).

4.7.3. Uji Identifikasi Alkaloid

Ekstrak kental yang didapatkan diambil sebanyak 1 gram, ditambahkan dengan 0,2 mL larutan HCl 2M dan aquades 2 mL lalu dipanaskan selama 2 menit kemudian campuran tersebut didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang didapatkan diidentifikasi dengan menggunakan reagen Meyer, Bouchardat, dan Dragendorf. Hasil yang menunjukkan adanya alkaloid dalam ekstrak dilihat dari endapan putih pada reagen Meyer, endapan coklat pada reagen Bouchardat, dan endapan jingga pada reagen Dragendorf (Nada & Rahayu, 2021).

4.7.4. Ekstraksi Cair-Cair

Ekstraksi cair-cair dilaksanakan dengan memakai pelarut organik seperti kloroform (Sholeha *et al.*, 2019). Ekstrak kental yang diperoleh digabungkan dengan 1,5 gram CaCO₃ serta 25 mililiter kloroform dalam corong pisah sebelum diaduk hingga terbentuk dua lapisan; larutan kloroform ditambahkan tiga kali. Ekstraksi ini dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Wardani & Fernanda, 2016). Lapisan yang diambil adalah lapisan fase kloroform yang dipisahkan kemudian ditampung dan diuapkan dalam lemari asam

hingga mendapatkan ekstrak kering berbentuk kristal (Sholeha *et al.*, 2019).

4.7.5. Pembuatan fase gerak

Aquabidestilata dan metanol digunakan untuk menyiapkan fase gerak. Larutan disaring di bawah vakum dengan kertas saring Whatman pada corong Buchner, kemudian diangin-anginkan selama 5 menit pada ultrasonikator. Fase gerak dicampurkan dengan perbandingan aquabidestilata : metanol 50:50 pada instrumen HPLC (Clara, 2018).

4.7.6. Pembuatan pelarut

Pembuatan pelarut dengan menggunakan aquabidestilata dan metanol dengan perbandingan 50:50. Kedua larutan tersebut disaring memakai kertas saring Whatman dengan bantuan vacuum pada corong buchner dan kemudian diangin-anginkan selama 5 menit pada ultrasonicator (Clara, 2018).

4.7.7. Pembuatan larutan baku kafein

Larutan stok baku kafein dibuat dengan melarutkan 25 mg kafein standar dalam 50 ml pelarut untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 500 ppm (Clara, 2018).

4.7.8. Optimasi HPLC

1) Optimasi laju alir

Menurut penelitian Rahim *et al.*, 2014, waktu retensi berkurang dengan naiknya laju aliran, dan semua puncak yang dihasilkan bisa diterima.

2) Penentuan fase gerak

Tujuan optimalisasi fase gerak ialah guna menetapkan perbandingan yang akan menghasilkan kromatogram terbaik dengan memakai permutasi fase gerak metanol: aquabidestilata (50:50), metanol: aquabidestilata:asam asetat glasial 2% (50:48:2), dan asetonitril:metanol:aquabidestilata (80:5:15) (Purwaningtyas, 2021).

3) Penentuan panjang gelombang

Panjang gelombang maksimal kafein pada konsentrasi 100, 300, serta 500 ppm ditentukan dengan menggunakan rangkaian larutan kafein dengan konsentrasi 500 ppm. Absorbansi masing-masing larutan kemudian diukur memakai spektrofotometer UV dengan panjang gelombang antara 200 dan 800 nm. Berdasarkan spektrum dengan serapan maksimal, panjang gelombang maksimum ditentukan (Yulius, 2018).

4.7.9. Pembuatan seri baku kafein

Seri baku kafein dibuat dengan konsentrasi 10, 50, 100, 200, 300 ppm. Larutan baku kafein 500 ppm diambil sebanyak 0,2; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 ml dan dilarutkn dengan 10 mL pelarut dalam labu takar. Masing-masing larutan seri baku kafein ditambahkan 40 μ L

NaOH 10 N. Selanjutnya masing-masing seri baku diekstraksi dengan kloroform sebanyak 1 ml memakai vortex yang diulang sebanyak tiga kali berturut-turut (Yulius, 2018).

4.7.10. Uji kesesuaian sistem

Sebelum validasi metode, harus dilakukan Uji Kesesuaian Sistem (UKS) untuk instrumen HPLC yang digunakan. UKS dilakukan dengan menyuntikkan larutan standar 500 ppm ke dalam sistem HPLC dalam kondisi tertentu. Injeksi harus diberikan lima sampai enam kali.

Parameter yang ada di UKS ini mengukur pengulangan, waktu retensi, dan luas permukaan larutan kafein standar. Hasil parameter ini dibandingkan dengan nilai penerimaan masing-masing. Puncak analit harus menampilkan pemisahan yang cukup. Persyaratan penerimaan $RSD < 2\%$ (Naveen *et al.*, 2018a).

4.7.11. Validasi metode analisis

1) Selektivitas/spesifitas

Selektivitas ditentukan dengan menguji standar terhadap potensi gangguan. Hal ini ditunjukkan dengan menyuntikkan enam ulangi injeksi larutan uji (sampel) 100% (Naveen *et al.*, 2018). Resolusi yang menyatakan selektivitas adalah puncak kromatogram yang berdekatan. Dianggap selektif jika nilainya lebih besar dari $R_s > 1,5$ (AOAC, 2013).

2) Linieritas

Linieritas ditentukan dari konsentrasi kafein yang berbeda-beda dengan mengencerkan larutan baku kafein sebanyak 3 kali. Larutan baku kafein kemudian disaring dan disuntikkan pada sistem HPLC. Kurva kalibrasi diperoleh dengan cara memplot daerah puncak terhadap konsentrasi, dan persamaan regresi linier dihitung. Koefisien korelasi juga dihitung (Naveen *et al.*, 2018).

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

LOD dihitung berdasarkan standar deviasi (SD) yang telah didapatkan dari perhitungan sebelumnya. Nilai LOD & LOQ diperoleh dari persamaan $LOD = 3,3 (SD/S)$ dan $LOQ = 10 (SD/S)$ (Naveen *et al.*, 2018).

4) Presisi

Presisi ditetapkan dengan menghitung persentase standar deviasi relatif (%RSD) dari konsentrasi kadar baku kafein yang berbeda (Naveen *et al.*, 2018a).

5) Akurasi

Akurasi dari metode diuji dengan recovery dari larutan baku kafein yang ditambahkan dengan sampel. Keakuratan metode diuji dengan melakukan pemulihan pada tiga tingkat solusi stok baku kafein yang berbeda ditambahkan ke sampel. Larutan baku kafein dibubuhi ke dalam sampel untuk menentukan pemulihan. Tiga volume berbeda (2, 4, 6 ml) baku

kafein dan 1 ml sampel (100 ppm) larutan ditambahkan ke dalam 10 ml labu ukur secara terpisah. Penyuntikan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Purwaningtyas, 2021).

4.7.12. Penetapan kadar alkaloid

Dua puluh gram bubuk biji kopi ditambahkan ke dalam 200 mililiter air suling dalam gelas kimia sambil diaduk. Larutan kopi panas disaring ke dalam labu Erlenmeyer menggunakan corong kaca yang dilapisi kertas saring. Filtrat yang dihasilkan dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 1,5 g kalsium karbonat (CaCO_3) kemudian diekstraksi empat kali dengan 25 mL kloroform ditambahkan ke setiap ekstraksi. Ekstrak (fase kloroform) diuapkan menggunakan rotary evaporator sampai semua kloroform menguap. Dalam labu ukur 100 mL, ekstrak kafein bebas pelarut diencerkan dengan air suling sampai tanda batas dan dihomogenkan. Solusinya kemudian dievaluasi menggunakan peralatan HPLC. Ekstrak kering bubuk biji kopi kemudian ditimbang sebanyak 0,01 gram hingga mencapai konsentrasi 1.000 ppm. Kemudian, masukkan ke dalam labu takar 10 mL dan isi hingga tanda garis dengan air suling. Sebelum larutan sampel diinjeksikan ke dalam instrumen HPLC, terlebih dahulu disaring (Susanti *et al.*, 2019).

Penentuan kadar alkaloid akan dihitung dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

C = Konsentrasi senyawa dalam larutan sampel ($\mu\text{g/ml}$)

V = Volume larutan sampel (ml)

Fp = Faktor pengenceran

W = Berat sampel (g)

4.8. Teknik Analisa data

Studi ini mengandalkan data primer yang diperoleh melalui pengukuran langsung konsentrasi alkaloid dalam biji kopi robusta memakai instrumen HPLC di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Dr. Soebandar Jember. Data yang didapat digunakan untuk menghasilkan kurva kalibrasi, dan parameter validasi metode, seperti nilai linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi, presisi, dan selektivitas ditentukan.

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1. Pembuatan ekstrak

Tabel 5.1 Hasil pembuatan ekstrak kental

Replikasi	Bobot sampel	Bobot ekstrak kental	Bobot rendemen
Replikasi 1	200,02 gram	24,65 gram \pm 0.626	12,32%
Replikasi 2	200,04 gram	25,75 gram \pm 0.626	12,87%
Replikasi 3	200,03 gram	25,72 gram \pm 0.626	12,85%
rata-rata = 200,03 gram		rata-rata = 25,70 gram	rata-rata = 12,68%

Ekstrak kental diperoleh dengan tiga kali replikasi. Penimbangan serbuk kopi robusta masing masing-masing replikasi adalah 200,02 gram, 200,04 gram dan 200,03 gram sehingga didapatkan ekstrak kental masing-masing sebanyak 24,65 gram, 25,75 gram dan 25,72 gram. Rata-rata bobot rendemen dari ketiga replikasi tersebut adalah 12,68%.

5.2. Uji identifikasi alkaloid

Identifikasi alkaloid pada Kopi Robusta dilakukan dengan menggunakan reagen meyer, dragendorf, dan bouchardat.

Tabel 5.2 Hasil pembuatan ekstrak kental

Reagen	Hasil
Meyer	Positif
Dragendorf	Positif
Bouchardat	Positif

Hasil yang diperoleh dari reagen meyer adalah endapan putih yang menyebar dengan ekstrak berubah warna menjadi coklat muda. Pada reagen dragendorf terdapat endapan berwarna jingga dan ekstrak berubah warna menjadi jingga. Sedangkan pada reagen bouchardat diperoleh hasil endapan coklat dengan ekstrak yang berubah warna menjadi lebih pekat.

5.3.Optimasi HPLC

Optimasi HPLC dilakukan dengan melihat beberapa kondisi optimal dari laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang dengan uraian sebagai berikut :

1) Optimasi laju alir

Laju alir ditentukan dengan menggunakan beberapa variasi yaitu 1,0; 2,0; dan 3,0 ml/menit. Kemudian dilihat Laju alir yang optimum diperoleh dalam optimasi laju alir adalah 1 mL/menit.

Tabel 5.3.1 Optimasi laju alir

Laju Alir	Symmetry	N > 2000	Tr	Rs
1,0	0.87	2006	1.493	2.78
2,0	0.66	1237	1,504	1.07
3,0	0.51	1169	1,203	1.28

Laju alir 1 ml/menit dipilih sebab memenuhi persyaratan pada nilai $N > 2000$, *symmetry*, dan resolusinya. Selain itu, waktu retensi pada laju alir 1 ml/menit memiliki nilai yang lebih singkat dibandingkan variasi laju alir 2,0 dan 3,0 ml/menit.

2) Penentuan fase gerak

Fase gerak yang dipilih ialah metanol: aquabidestilata dengan perbandingan 70:30 dikarenakan fase gerak dengan perbandingan ini menghasilkan kromatogram yang optimal.

Tabel 5.3.2 Penentuan fase gerak

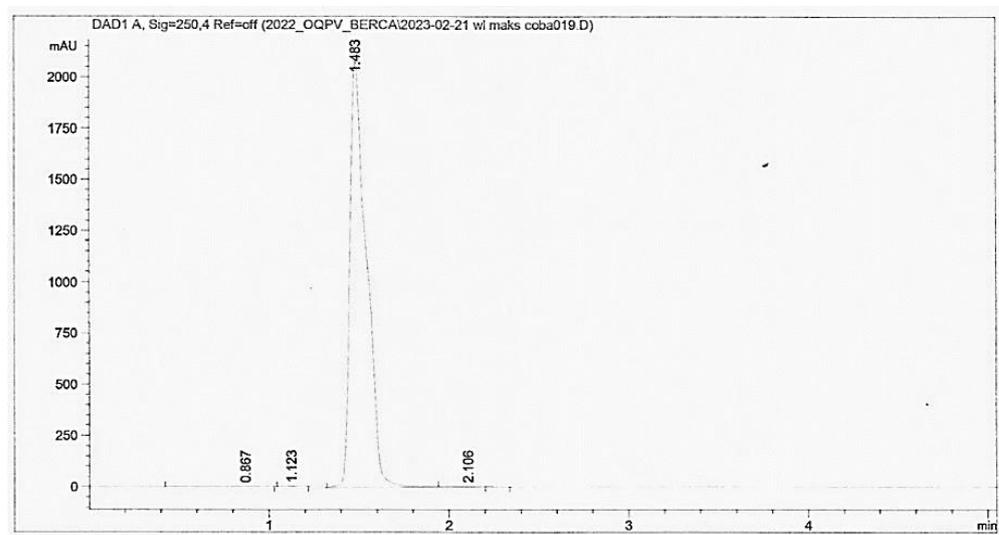
Komposisi Fase Gerak	Symmetry	N>2000	tR
Metanol:Aquabidestilata (50:50)	0.25	415	2.20
Metanol:Aquabidestilata (30:70)	0.16	718	2.14
Metanol:Aquabidestilata (70:30)	0.46	1130	1.48

Pembuatan fase gerak ditentukan dengan menggunakan metanol : *aquabidestilata* dengan tiga variasi perbandingan 50:50; 30:70; dan 70:30. Pada perbandingan 70:30 didapatkan *symmetry*, $N > 2000$, dan

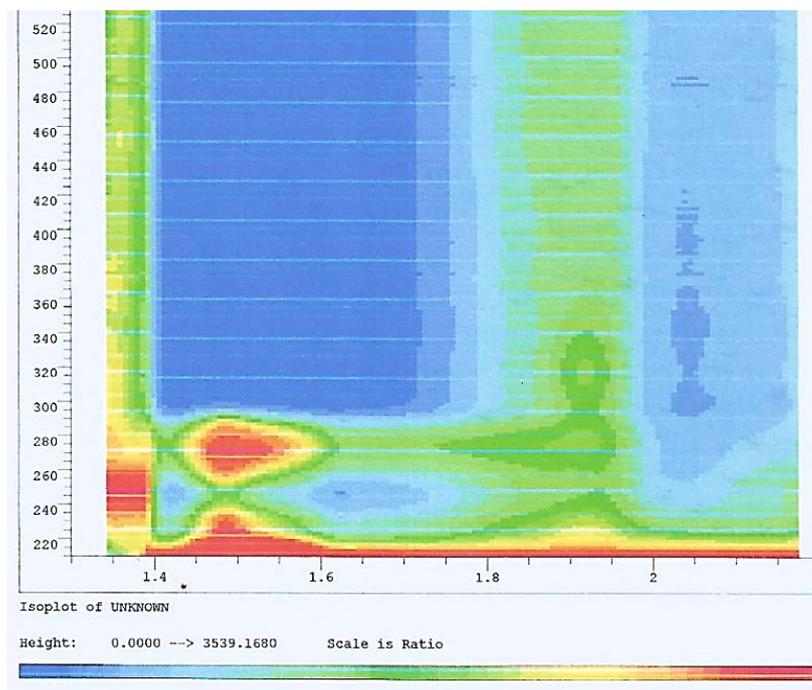
waktu retensi yang memenuhi persyaratan dan sesuai dengan hasil optimasi pada laju alir.

3) Penentuan panjang gelombang

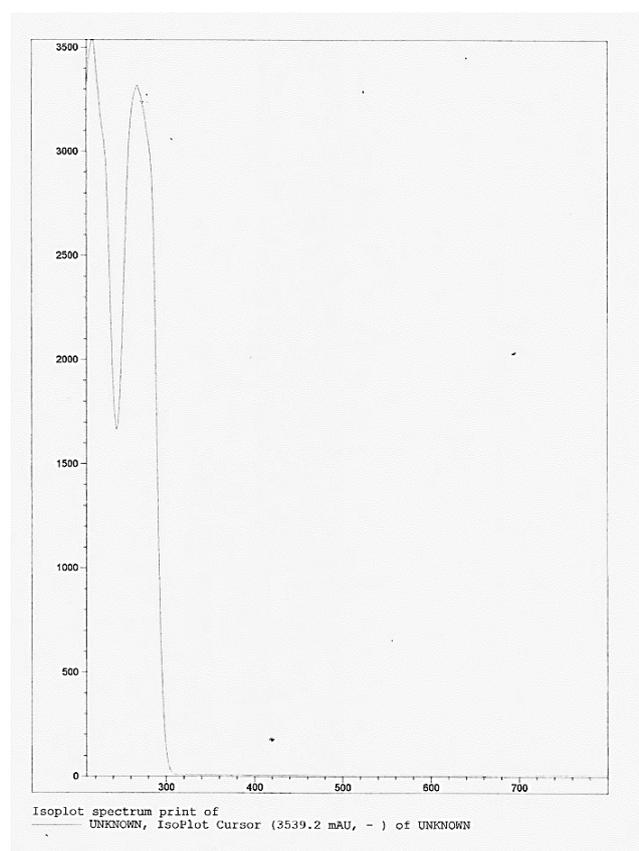
Penentuan panjang gelombang dilaksanakan memakai larutan baku standar kafein konsentrasi 100 ppm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan menggunakan *spectrum* pada instrumen HPLC. Panjang gelombang maksimum yang dihasilkan pada *spectrum* HPLC adalah 272 nm. Panjang gelombang maksimum yang muncul kemudian ditinjau pada metode validasi yang akan digunakan. Hasil yang diperoleh adalah panjang gelombang 272 nm yang menghasilkan kromatogram cukup tajam.



Gambar 5.3.1 Kromatogram panjang gelombang 272 nm



Gambar 5.3.2 Spektrum panjang gelombang 272 nm



Gambar 5.3.3 Isoplot 2D panjang gelombang 272 nm

5.4. Uji kesesuaian sistem

Uji kesesuaian sistem dilaksanakan memakai larutan induk standar kafein dengan konsentrasi 100 ppm dan diinjeksikan dengan 6x pengulangan.

Tabel 5.4 Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

Replikasi	tR (menit)	Area
1	1.498	6942.00195
2	1.474	6904.02393
3	1.498	6720.94922
4	1.477	6857.85498
5	1.541	6742.32861
6	1.529	6942.57422
SD	0.027154496	98.23041741
Rata-rata	1.502833333	6851.622152
RSD	0.018068867	0.014336812

Hasil RSD yang diperoleh dari uji kesesuaian sistem adalah 0.018068 dan 0.14336 sehingga dapat disimpulkan bahwa sistem sesuai.

5.5. Validasi metode analisis

5.6.1. Selektivitas

Parameter selektivitas ditentukan dengan melakukan penyuntikan sampel kopi robusta dan dilihat kromatogram dan resolusi yang dihasilkan. Selektivitas dilakukan dengan 4 kali penyuntikan.

Tabel 5.6.1 Selektivitas

Replikasi	Nama pengujian	Rs	tR	Purity Factor
1	Standar tanpa pengganggu	-	1.490	998.886
2	Sampel tanpa pengganggu	-	1.545	999.693
3	Standar dengan analit lain	2.42	1.537	998.192
4	Sampel dengan analit lain	1.87	1.481	999.080

Hasil resolusi yang didapat bisa dilihat pada tabel. Syarat resolusi adalah $>1,5$. Dilihat dari hasil yang didapat maka bisa disimpulkan kalau

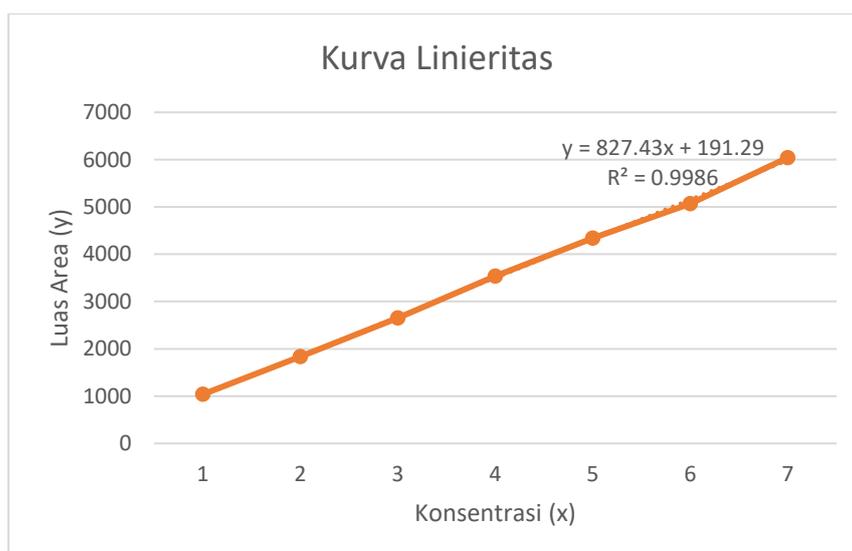
senyawa kafein dapat dianalisis dengan menggunakan metode yang dipilih.

5.6.2. Linieritas

Linieritas ditentukan dengan menggunakan 7 titik konsentrasi standar kafein 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Linieritas jika memenuhi kriteria dengan koefisien relasi <0.990 maka nilai tersebut dapat dikatakan memiliki linieritas yang baik (Naveen *et al.*, 2018).

Tabel 5.6.2 Linieritas

Konsentrasi (ppm) (x)	Area (mAU) (y)
10,28	1038.09985
20,56	1834.52454
30,84	2149.08472
41,12	3435.10913
51,4	4042.26782
82,24	5965.95068
102,8	6042.13867
$Y = 827.43x + 191.29$	
$r = 0.9986$	
$V_{xo} = 1.141393269$	



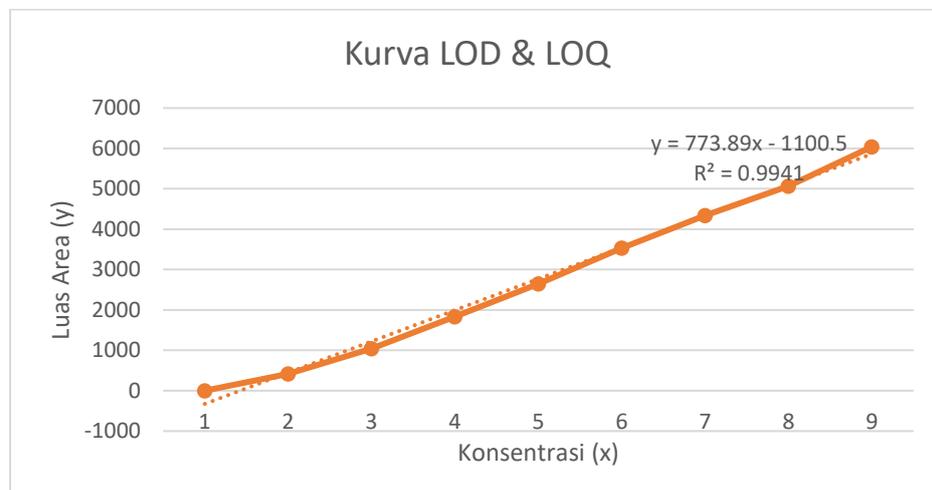
Gambar 5.6.1 Kurva linieritas

5.6.3. LOD dan LOQ

LOD dan LOQ ditetapkan memakai 8 titik konsentrasi terendah. Nilai LOD dan LOQ ditetapkan dengan menggunakan rumus $3 \cdot SD/b$ dan $10 \cdot SD/b$.

Tabel 5.6.3 LOD & LOQ

Konsentrasi (ppm) (x)	Area (mAU) (y)
0	0
5,14	413.90451
10,28	1038.09985
20,56	1834.52454
30,84	2149.08472
41,12	3435.10913
51,4	4042.26782
82,24	5965.95068
$Y = 773.89x - 1100.5$	
$r = 0.9941$	
$SD = 823.1013939$	
$V_{x0} = 2.779576876$	
$LOD = 3.509845843$	
$LOQ = 10.6358965$	



Gambar 5.6.3 Kurva LOD & LOQ

5.6.4. Presisi

Presisi diperoleh dengan dilakukan pengukuran menggunakan persamaan regresi $y = 791.65x + 409.64$ dengan $r = 0,9984$. Presisi ditentukan dengan penyuntikan berulang sebanyak 6 kali pada masing-

masing konsentrasi. Hasil presisi ditampilkan dengan nilai %KV yang tak lebih dari 2%.

Tabel 5.6.4 Presisi

Konsentrasi	Area	Konsentrasi (x)	\bar{x}	SD	%KV
80%	5802.70117	6.812431213	6.956296293	0.124078168	0.015673362
	5833.86768	6.851800265			
	5901.81494	6.93763019			
	5943.1167	6.989801933			
	5989.41113	7.048280339			
	6028.64014	7.097833815			
100%	6377.0083	7.537887071	7.791401457	0.219584521	0.027737576
	6463.73877	7.647443656			
	6575.73535	7.788915998			
	6652.63428	7.886053534			
	6826.57422	8.105771768			
	6570.52686	7.782336714			
120%	7326.55470	8.73733934	8.98711351	0.241473064	0.030502503
	7393.24365	9.29674657			
	7413.85400	8.84761448			
	7433.03174	8.8718395			
	7516.11570	8.97678989			
	7129.40088	9.19235128			

5.6.5. Akurasi

Nilai akurasi dapat dilihat dari hasil %recovery standar baku kafein dengan menggunakan beberapa konsentrasi. Nilai rata-rata %recovery memiliki rentang 90-110% dalam konsentrasi 50 ppm. Akurasi dapat diterima jika berada dalam rentang tersebut.

Tabel 5.6.5 Akurasi

Konsent rasi	Luas Area	x	\bar{x}	% Recovery	\bar{x} % Recovery	SD	%RSD
80%	5926.61475	6.96896	6.80631	100.00524	93.44677	1.08769	0,13446
	5803.66375	6.81365		93.74274			
	5663.28467	6.63632		86.59233			
100%	6250.80713	7.3784	8.39994	93,21193	93.98397	0.30814	0.03809
	6278.28613	7.4132		94.33451			
	6280.02686	7.4154		94.40548			
120%	7118.47217	8.47449	9.53912	107.14147	109.60991	0.15805	0.01954
	7129.40088	8.48829		107.51257			
	7325.62549	8.73616		114.17568			

5.6. Penetapan kadar alkaloid

Kadar alkaloid dalam ekstrak etanol biji kopi robusta dihitung dengan memasukkan persamaan regresi $y = 808.88x - 524.84$, kemudian dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kadar alkaloid total} = \frac{\text{konsentrasi } \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \text{volume sampel}}{\text{berat sampel}} \times \text{fp}$$

(Purwaningtyas, 2021)

Tabel 5.6.5 Penetapan kadar alkaloid

Replikasi Sampel	Luas Area (AUC)	x	Kadar alkaloid	\bar{x} Kadar alkaloid	SD	RSD
1	2845.92627	4.1672019	4.12594247	4.46005229	0.441239	0.0005455
2	3160.00293	4.55548775	4.51038391			
3	3312.34961	4.74383049	4.74383049			
\bar{x} Kadar alkaloid \pm SD				4.46005229 \pm 0.441239		

BAB 6 PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan sampel biji kopi robusta yang diambil dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao di Kabupaten Jember yang bertujuan untuk mengetahui kondisi yang optimum pada sistem HPLC yang meliputi parameter laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang. Selain itu, penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode HPLC bisa dipakai guna memisahkan senyawa yang terdapat pada sampel kopi robusta. Validasi metode dilakukan dengan mengukur parameter selektivitas, linieritas, LOD & LOQ, akurasi, dan presisi.

Kopi tidak hanya memiliki kandungan senyawa alkaloid melainkan terkandung senyawa kimia lainnya yaitu golongan flavonoid, tanin, terpenoid, dan saponin. Untuk memisahkan senyawa alkaloid dari biji kopi robusta maka dipilih metode yang mampu melakukan pemisahan dengan baik. Pemilihan metode HPLC pada penelitian ini karena diketahui HPLC memiliki kemampuan untuk memisahkan senyawa yang terkandung dalam kopi dengan selektif (Arwangga *et al.*, 2016).

Penelitian ini dilakukan dengan melakukan tahapan ekstraksi serbuk biji kopi robusta. Ekstraksi dilaksanakan dengan metode maserasi selama 7 hari memakai pelarut etanol 96% dan diaduk selama satu kali 24 jam dengan lama pengadukan 5 menit. Hasil dari ekstraksi maserasi kemudian akan dilakukan penyaringan agar ampas biji kopi robusta dapat terpisah. Hasil yang diperoleh akan diuapkan dengan menggunakan waterbath hingga pelarut menguap dengan

sempurna dan dihasilkan ekstrak kental yang dapat digunakan pada tahap penelitian selanjutnya.

Sampel biji kopi robusta diambil di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao diekstraksi dengan tiga kali replikasi sehingga menghasilkan ekstrak kental dengan total rata-rata hasil ekstrak kental 25,70 gram. Ekstrak kental diperoleh dari penimbangan simplisia rata-rata sebanyak 200,03 gram dengan pelarut etanol 96% dan di ekstraksi selama 7 hari. Ekstrak kental diperoleh dengan pemanasan yang bertujuan guna menguapkan pelarut yang ada dalam proses maserasi. Suhu pemanasan yang dipakai guna penguapan adalah 50°C. Hasil rata-rata rendemen yang didapat dari proses ekstraksi yakni 12,68%.

Pemilihan pelarut dan suhu pada ekstraksi maserasi dapat memengaruhi kadar kafein yang terkandung dalam kopi robusta. Makin tinggi konsentrasi dan suhu pelarut yang dipakai maka akan makin baik hasil rendemen dari sampel tersebut. Namun jika suhu yang digunakan terlalu tinggi dapat mengakibatkan penguapan senyawa kimia yang ada didalam sampel. Senyawa alkaloid memiliki kerangka karbon yang banyak dan bersifat polar sehingga menunjukkan bahwa senyawa tersebut sukar larut didalam air, sehingga dipilih pelarut etanol 96% yang memiliki kandungan air lebih sedikit dan bersifat polar (Juliantari *et al.*, 2018).

Ekstrak kental yang didapat lalu dilaksanakan uji identifikasi senyawa golongan alkaloid dengan penambahan reagen meyer, dragendorf, dan bouchardat. Uji identifikasi bertujuan untuk melihat sampel yang sudah diekstraksi masih mengandung senyawa alkaloid. Hasil yang didapat dari pengujian dengan reagen

meyer adalah endapan putih yang menyebar dengan ekstrak berubah warna menjadi coklat muda. Pada reagen dragendorff terdapat endapan berwarna jingga dan ekstrak berubah warna menjadi jingga. Sedangkan pada reagen bouchardat diperoleh hasil endapan coklat dengan ekstrak yang berubah warna menjadi lebih pekat. Berdasarkan hasil pengujian maka dapat disimpulkan bahwa sampel kopi tersebut mengandung senyawa alkaloid (Nada & Rahayu, 2021).

Ekstrak kental selanjutnya di ekstraksi cair-cair sebanyak 10 mg ekstrak kental dengan penambahan kloroform 25 mL dan CaCO_3 1,5 gram. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan corong pemisah sehingga diperoleh fase kloroform yang selanjutnya diuapkan dan diperoleh ekstrak kering. Ekstrak kering kemudian dilarutkan dengan pelarut hingga 100 mL. Ekstraksi cair-cair bertujuan untuk memisahkan ekstrak menjadi fraksi-fraksi senyawa tunggal (Tetti, 2014). Kloroform dipilih karena diketahui senyawa alkaloid sukar larut didalam air, etanol, dan eter namun mudah larut didalam kloroform. Selain itu ekstraksi ini menggunakan CaCO_3 yang digunakan untuk membantu mempermudah kandungan kafein lepas dari larutan kopi robusta (Indonesia, 2014).

Optimasi HPLC dilakukan dengan mengukur parameter laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang. Penentuan laju alir dilakukan di instrumen HPLC dengan dilakukannya penyuntikan standar baku kafein. Penyuntikan dilakukan sebanyak tiga kali dengan laju alir yang bervariasi. Variasi laju alir yang digunakan dalam optimasi ini adalah 1,0; 2,0; dan 3,0 mL/menit. Kondisi optimal dari laju alir adalah 1,0 mL/menit karena hasil yang diperoleh dari

symmetry, resolusi dan $N > 2000$ memenuhi persyaratan dibandingkan dengan variasi laju alir lainnya (AOAC, 2013).

Fase gerak ditentukan dengan menggunakan komposisi metanol dan aquabidestilata tiga variasi. Perbandingan 50:50 menghasilkan kromatogram yang tidak tajam sehingga dilakukan uji coba pada perbandingan lainnya. Perbandingan kedua 30:70 menghasilkan kromatogram yang tidak tajam memuncak sehingga dapat dikatakan tidak optimal. Perbandingan terakhir yang diujikan adalah 70:30 dengan metanol yang lebih banyak, hasil yang diperoleh dari perbandingan ini kromatogram memiliki puncak yang cukup tajam sehingga dapat dikatakan optimal. Perbandingan metanol lebih tinggi dibandingkan dengan aquabidestilata dikarenakan metanol memiliki kemampuan melarutkan senyawa golongan alkaloid terutama kafein dengan cukup sempurna. Golongan senyawa alkaloid umumnya bersifat non polar yang lebih banyak ditemukan pada pelarut polar sehingga dipilih metanol yang memiliki kemampuan mengekstrak senyawa dengan berat molekul yang rendah (Yisak *et al.*, 2018)

Panjang gelombang umumnya dideteksi dengan memakai Spektrofotometri UV-Vis tetapi pada penelitian ini optimasi panjang gelombang dilaksanakan dengan menggunakan spektrum yang ditampilkan dalam monitor software HPLC. Penentuan ini dilakukan dengan penyuntikan standar baku kafein yang sudah dibuat lalu dilihat isoplot 2D dan 3D sehingga dapat ditentukan panjang gelombang maksimumnya. Panjang gelombang yang didapat dari prosedur tersebut adalah 272 nm. Pemilihan deteksi panjang gelombang maksimum dengan menggunakan instrumen HPLC bertujuan agar memudahkan validasi

metode yang akan dilakukan. Panjang gelombang maksimum kafein berkisar pada 272 nm (Fajriana & Fajriati, 2018).

Berdasarkan hasil pengoptimalan kondisi HPLC menggunakan larutan standar kafein, kondisi optimal telah ditentukan menjadi laju alir 1,0 mL/menit, fase gerak metanol: aquabidestilata (70:30), dan panjang gelombang dari 272 nm.

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan penyuntikkan berulang sebanyak 6 kali dengan menggunakan konsentrasi 100 ppm. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode terpilih sebelumnya. Hasil RSD yang diperoleh dari uji kesesuaian sistem ini adalah 0,018068867% untuk waktu retensi dan 0,014336812% untuk luas area. Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan mengukur keterulangan dari standar baku kafein untuk memastikan persyaratan dari presisi dengan mengukur nilai RSD. Syarat keberterimaan RSD <2% dengan puncak analit yang memiliki daya pisah baik (AOAC, 2013).

Selektivitas ditentukan dengan melakukan penyuntikan standar baku dan sampel yang telah dibuat. Selektivitas dilakukan untuk menganalisis analit secara selektif. Hasil dari uji selektivitas ditentukan dengan nilai resolusi. Pada studi ini nilai resolusi ditetapkan dengan melihat kromatogram sampel dan standar, resolusi yang dihasilkan pada senyawa kafein saja adalah 0 yang artinya menunjukkan bahwa selektif pada senyawa kafein. Sedangkan untuk pengujian dengan analit lain dihasilkan resolusi masing-masing 1.87 dan 2.42 yang artinya terjadi pemisahan secara selektif antara senyawa kafein dengan analit lain. Berdasarkan hasil resolusi yang diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa

senyawa kafein mampu dianalisis dengan menggunakan metode tersebut. Guna memenuhi kriteria selektivitas, suatu metode dipersyaratkan guna mempunyai nilai resolusi $>1,5$ (Naveen *et al.*, 2018a).

Selain nilai resolusi, parameter lain yang diperoleh dalam uji selektivitas adalah purity factor yang mempengaruhi adanya analit didalam sampel yang di injeksikan. Purity factor yang diperoleh dalam standar dan sampel tanpa analit lain masing-masing adalah 998.886 dan 999.693, sedangkan dalam standar dan sampel dengan analit lain masing-masing adalah 998.192 dan 999.080. berdasarkan hasil yang diperoleh standar dan sampel tanpa analit lain memiliki kemurnian yang cukup tinggi sedangkan standar dan sampel dengan analit lain memiliki kemurnian yang buruk. Nilai purity factor yang baik memiliki nilai 95% kemurnian (AOAC, 2013).

Langkah selanjutnya adalah menentukan linearitas dengan menyiapkan tujuh macam larutan standar kafein dengan rentang 10 ppm sampai 100 ppm. Berdasarkan temuan penelitian, ditentukan persamaan regresi $y = 791,65x + 409,64$ dengan nilai $r = 0,9986$. Linearitas menampilkan kapasitas suatu metode guna menentukan proporsionalitas hubungan kurva standar antara respon (y) dan konsentrasi (x). Persamaan kurva standar adalah $y = bx + a$, di mana b ialah nilai kemiringan, a adalah perpotongan, dan r adalah koefisien korelasi. Linearitas ditentukan dengan mengukur konsentrasi setidaknya enam konsentrasi larutan seri kurva standar. Sebagai parameter adanya hubungan linier dipakai koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$ (AOAC, 2013).

Parameter LOD & LOQ dilakukan dengan membuat 8 konsentrasi dari titik terendah. Konsentrasi yang dipakai dalam pengukuran ini ialah 0 ppm – 80 ppm. Persamaan regresi yang dihasilkan adalah $y = 773.89x - 1100.5$ dengan nilai $r = 0.9941$. LOD & LOQ dihitung berdasarkan standar deviasi (SD) sehingga dihasilkan nilai LOD 3.509845843 ppm dan LOQ 10.6358965 ppm. Batas tersebut dihitung dengan menggunakan persamaan $LOD = 3,3 (SD/S)$ dan $LOQ = 10 (SD/S)$ (Naveen *et al.*, 2018a)

Selanjutnya dilakukan penentuan presisi. Uji presisi dilakukan dengan pengulangan penyuntikkan konsentrasi terpilih sebanyak 6 kali pengulangan di masing-masing konsentrasi. Konsentrasi yang dipakai pada uji ini ialah 80%, 100%, dan 120%. Hasil yang diperoleh dari konsentrasi 80% adalah 0,015012755%, konsentrasi 100% adalah 0,026568482%, dan konsentrasi 120% adalah 0,02921687%. Metode analisis dikatakan presisi jika memberikan nilai koefisien korelasi (KV) kurang dari 2%. Nilai yang diperoleh lolos dari kriteria persetujuan uji presisi karena masih di bawah ambang batas 2%. Oleh karena itu, hasil ini menunjukkan bahwa metode analisis uji presisi sudah tepat (AOAC, 2013).

Selanjutnya dilakukan penentuan akurasi. Uji akurasi dilakukan dengan replikasi konsentrasi terpilih sebanyak 3 kali di masing-masing konsentrasi. Konsentrasi yang dipakai pada uji ini yakni 80%, 100%, dan 120%. Hasil yang diperoleh dari konsentrasi 80% adalah 93.44677%, konsentrasi 100% adalah 93.98397%, dan konsentrasi 120% adalah 109.60991%. Metode analisis dikatakan akurat jika memberikan nilai recovery berkisar antara 90-110%

dengan konsentrasi 50 ppm. Nilai yang didapat sudah memenuhi kriteria keberterimaan uji akurasi sebab berada dalam rentang yang dipersyaratkan. Sehingga hasil ini menampilkan kalau metode analisis memiliki keakuratan yang baik (AOAC, 2013).

Penetapan kadar kafein dalam sampel kopi robusta dihitung dengan memakai hasil validasi metode analisis yang dilakukan dalam prosedur sebelumnya. Temuan validasi metode analisis yang sudah diperoleh dari sistem HPLC dengan fase gerak metanol : *aquabidestilata* (70:30), fase diam kolom *poroshell* 120 EC C-18, kecepatan alir 1,0 mL/menit dan dengan detektor *Diode-Array Detectors* (DAD) pada panjang gelombang 272 nm kemudian divalidasi dengan parameter validasi seperti spesifisitas, linieritas, limit deteksi (LOD), limit kuantitasi (LOQ), presisi dan akurasi.

Setelah memenuhi semua persyaratan validasi, bisa disimpulkan kalau metode yang digunakan dalam penelitian ini valid dan dapat digunakan untuk menentukan kadar sampel kopi Robusta. Pengujian dilakukan dengan menyuntikkan larutan sampel sebanyak tiga kali ulangan dengan konsentrasi rata-rata 50 ppm. Luas yang dihasilkan dari injeksi larutan sampel pertama, seperti yang ditentukan oleh penelitian, adalah 2845.92627 ppm, luas yang dihasilkan dari injeksi kedua adalah 3160.00293 ppm, dan luas yang dihasilkan dari injeksi ketiga adalah 3312.34961 ppm. Kadar senyawa alkaloid yang diperoleh adalah 3,106092% (%b/b). Rata-rata kadar alkaloid \pm SD yang diperoleh 4.46005229 ± 0.441239 .

Berdasarkan hasil validasi metode analisis bisa disimpulkan kalau metode HPLC yang dipakai guna memvalidasi metode analisis dan penentuan kandungan kafein pada sampel kopi robusta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Kabupaten Jember adalah valid.

BAB 7 KESIMPULAN

1. Kondisi optimum dari metode analisis HPLC ialah laju alir 1,0 mL/menit, fase gerak metanol : aquabidestilata (70:30), dan panjang gelombang 272 nm.
2. Validasi metode analisis mempunyai validitas yang baik yang memenuhi parameter selektivitas, linieritas, akurasi, presisi, serta LOD & LOQ. Nilai selektivitas diperoleh resolusi sebesar 2.42 dan 1.87, linieritas diperoleh $r = 0.9986$ dan $V_{xo} = 1.141393269$, LOD 3.509845843 dan LOQ 10.6358965, akurasi diperoleh nilai rata-rata recovery 93-110%, dan presisi diperoleh %KV masing-masing konsentrasi adalah 0.015673362, 0.027737576, 0.030502503.
3. Hasil uji penetapan kadar alkaloid menampilkan ekstrak etanol biji kopi robusta sebesar 3,106092% (%b/b). Rata-rata yang diperoleh dari kadar alkaloid \pm SD yang diperoleh 4.46005229 ± 0.441239

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi, K., Abdollahzadeh, Y., Asadollahzadeh, M., Hemmati, A., Tavakoli, H., & Torkaman, R. (2015). Chemometric assisted ultrasound leaching-solid phase extraction followed by dispersive-solidification liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides in soil samples. *Talanta*, *137*, 167–173.
- Aida, F., Nada, Q., Rahayu, T., & Hayati, A. (2021). Analisis Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Sangrai Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dari Tanaman Hasil Pemupukan Organik dan Anorganik Phytochemical Screening Analysis and Antioxidant Activity of Robusta Coffee Roasted Seeds (*Coffea canephora*) extract from Organic and Inorganic Fertilized Plants. *Jurnal Ilmiah SAINS ALAMI (Known Nature)*, *3*.
- Amalia, K. R., & Ulfah, M. (2015). Perbandingan Metode Spektrofotometri Ultraviolet (Uv) Dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Kckt) Pada Penetapan Kadar Natrium Diklofenak. *Jurnal Ilmu Farmasi Dan Farmasi Klinik*, 48–57.
- AOAC. (2013). *AOAC Validation Botany*.
- Arikalang, T. G. (2018). Optimasi dan validasi metode analisis dalam penentuan kandungan total fenolik pada ekstrak daun geddi hijau (*Abelmoschus manihot* L.) yang diukur dengan spektrofotometer UV-vis. *PHARMACON*, *7*(3).
- Arwangga, A. F., Asih, I. A. R. A., & Sudiarta, I. W. (2016). Analisis kandungan kafein pada kopi di Desa Sesaot Narmada menggunakan spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*.
- Aulia, S. S., & Muchtaridi, M. (2016). Penetapan Kadar Simvastatin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Farmaka*, *14*(4), 70–78.
- Budiman, H., Rahmawati, F., & Sanjaya, F. (2015). Isolasi dan Identifikasi Alkaloid pada Biji Kopi Robusta (*Coffea Robusta Lindl. Ex De Will*) dengan Cara Kromatografi Lapis Tipis. *CERATA Jurnal Ilmu Farmasi*, *1*(1).
- Chairgulprasert, V., & Kongsuwankeeree, K. (2017). Preliminary phytochemical screening and antioxidant activity of robusta coffee blossom. *Science & Technology Asia*, 1–8.
- Chairunnisa, S., Wartini, N. M., & Suhendra, L. (2019). Pengaruh suhu dan waktu maserasi terhadap karakteristik ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana* L.) sebagai Sumber Saponin. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri ISSN*, *2503*, 488X.
- Clara, M. (2018). *Validasi Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fase Terbalik pada Penetapan Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk Murni Robusta Merek "X."*

- El, M., Ghanjaoui, A., Ghanjaoui, M. E., Mandil, A., Ait, A., Mou, S., & Slimani, R. (2020). High performance liquid chromatography quality control Analytical Chemistry View project Analytical chemistry View project International Journal of Advanced Chemistry High performance liquid chromatography quality control. In *International Journal of Advanced Chemistry* (Vol. 8, Issue 1).
- Eserian, J. K., & Lombardo, M. (2015). Method validation in pharmaceutical analysis: from theory to practical optimization. *INNOVATIONS in Pharmacy*, 6(1).
- Fajriana, N. H., & Fajriati, I. (2018). Analisis kadar kafein kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) pada variasi temperatur sangrai secara spektrofotometri ultra violet. *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 3(2).
- Farhaty, N., & Muchtaridi, M. (2016). Tinjauan kimia dan aspek farmakologi senyawa asam klorogenat pada biji kopi. *Farmaka*, 14(1), 214–227.
- Farida, A., Ristanti, E., & Kumoro, A. C. (2013). Penurunan Kadar kafein dan asam Total pada biji kopi robusta menggunakan teknologi fermentasi anaerob fakultatif dengan mikroba Nopkor MZ-15. *Jurnal Teknologi Kimia Dan Industri*, 2(2), 70–75.
- Gallant, S. R., Vunnum, S., & Cramer, S. M. (1996). Optimization of preparative ion-exchange chromatography of proteins: linear gradient separations. *Journal of Chromatography A*, 725(2), 295–314.
- Hammado, N. (2013). Identifikasi Senyawa Bahan Aktif Alkaloid pada Tanaman Lahuna (*Eupatorium odoratum*).
- Ilmiana, R. (2022). Validasi Metode Analisis Spektrofotometri Uv-Vis pada Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*).
- Indonesia, K. (2014). Farmakope Indonesia (Edisi V). In *Jakarta: Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan*.
- Juliantari, N. P. D., Wrasiasi, L. P., & Wartini, N. M. (2018). Karakteristik Ekstrak Ampas Kopi Bubuk Robusta (*Coffea Canephora*) pada Perlakuan Konsentrasi Pelarut Etanol dan Suhu Maserasi Characteristics Of Coffee Grounds Robusta Extract (*Coffea canephora*) In The Treatment Of Ethanol Solvent Concentration And Maceration Temperature. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri ISSN*, 2503, 488X.
- Kuncoro, B. (2017). Uji Kesesuaian Sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fase Terbalik pada Bahan Baku Parasetamol. *Jurnal Farmagazine*, 1(2), 35–41.
- Nada, F. A. Q., & Rahayu, T. (2021). Analisis skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak biji sangrai kopi robusta (*Coffea canephora*) dari tanaman hasil pemupukan organik dan anorganik. *Jurnal SAINS ALAMI (Known Nature)*, 3(2).

- Naveen, P., Lingaraju, H. B., Deepak, M., Medhini, B., & Prasad, K. S. (2018a). Method development and validation for the determination of caffeine: an alkaloid from *coffea arabica* by high-performance liquid chromatography method. *Pharmacognosy Research*, *10*(1), 88.
- Naveen, P., Lingaraju, H. B., Deepak, M., Medhini, B., & Prasad, K. S. (2018b). Method development and validation for the determination of caffeine: an alkaloid from *coffea arabica* by high-performance liquid chromatography method. *Pharmacognosy Research*, *10*(1), 88.
- Nurdiansyah, Y., Wardana, I., Tajuddin, M., Ilmi, N., & Islami, A. (2017). Menentukan Bibit Kopi yang Cocok Ditanam di Kecamatan Sumberjambe Kabupaten Jember Menggunakan Metode Forward Chaining. In *Informatics Journal* (Vol. 2, Issue 3).
- Oeyen, E., Van Mol, K., Baggerman, G., Willems, H., Boonen, K., Rolfo, C., Pauwels, P., Jacobs, A., Schildermans, K., & Cho, W. C. (2018). Ultrafiltration and size exclusion chromatography combined with asymmetrical-flow field-flow fractionation for the isolation and characterisation of extracellular vesicles from urine. *Journal of Extracellular Vesicles*, *7*(1), 1490143.
- Oktadina, F. D., Argo, B. D., & Hermanto, M. B. (2013). Pemanfaatan nanas (*Ananas comosus* L. Merr) untuk penurunan kadar kafein dan perbaikan citarasa kopi (*coffea* sp) dalam pembuatan kopi bubuk. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis Dan Biosistem*, *1*(3).
- Purwaningtyas, D. (2021). Validasi Metode Analisis dan Penetapan Kadar Kafein Menggunakan Metode KCKT Fase Terbalik pada Sampel Teh Hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur.
- Puslitkoka. (2019). Selayang Pandang Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember. <https://iccri.net/>
- Rahim, A. A., Nofrizal, S., & Saad, B. (2014). Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column. *Food Chemistry*, *147*, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.131>
- Rasyid, R., Sanjaya, W. F., & Zulharmita, Z. (2017). Penetapan Kadar Kofein Daun Kopi Kawa (*Coffea Robusta*, Lind). *Jurnal Farmasi Higea*, *5*(2), 137–143.
- Rizky, T. A., & Saleh, C. (2016). Analisis Kafein Dalam Kopi Robusta (Toraja) Dan Kopi Arabika (Jawa) Dengan Variasi Siklus Pada Sokletasi. *Jurnal Kimia Mulawarman*, *13*(1).
- Sabir Azim, M. D., Moloy, M., & Bhasin, P. (2013). HPLC method development and validation: A review. *Int Res J Pharm*, *4*, 39–46.
- Sadegh-Zadeh, F. (2011). Comparison between UV-spectrophotometry and HPLC methods to determine napropamide. *International Journal of Soil Science*, *6*(3), 199–208.

- Septiningtyas, D., Teknologi, I., & Nopember, S. (2018). Kandungan Kafein Pada Kopi dan Pengaruh Terhadap Tubuh. <https://www.researchgate.net/publication/325202688>
- Setyoningsih, G. I. (2019). Penetapan Kadar Kafein Dalam Kopi Bubuk Murni Robusta Merek “X” Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometri. *Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta, Indonesia*.
- Sholeha, D. N., Muhamat, M., & Anwar, K. (2019). Uji Aktivitas Fraksi Petroleum Eter Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) Sebagai Larvasida terhadap Nyamuk *Aedes aegypti*. *Jurnal Pharmascience*, 5(2).
- Soemiati, A. (2013). *Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (Piperis retrofracti fructus)*.
- Susanti, H., Araaf, N. P. M., & Kusbandari, A. (2019). Perbandingan metode spektrofotometri UV dan hplc pada penetapan kadar kafein dalam kopi. *Majalah Farmasetika*, 4, 28–33.
- Tedder, D. W. (2013). Liquid-liquid extraction. In *Albright's Chemical Engineering Handbook*; CRC Press, New York.
- Tetti, M. (2014). Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*, 7(2).
- Virgiawan. (2021). Kontribusi Desain Terhadap Pemasaran Kedai Kopi pada Masa Pandemi COVID-19. In *Prosiding Seminar Nasional Desain Sosial*.
- Wahyuni, D. T., & Widjanarko, S. B. (2015). Pengaruh Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi terhadap Ekstrak Karotenoid Labu Kuning dengan Metode Gelombang Ultrasonik [In Press April 2014]. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, 3(2), 390–401.
- Wardani, R. K., & Fernanda, M. A. H. F. (2016). Analisis kadar kafein dari serbuk teh hitam, teh hijau dan teh putih (*camellia sinensis* l.). *Journal Pharmasci (Journal of Pharmacy and Science)*, 1(1), 15–17.
- Wiese, S., Teutenberg, T., & Schmidt, T. C. (2011). A general strategy for performing temperature-programming in high performance liquid chromatography—Prediction of segmented temperature gradients. *Journal of Chromatography A*, 1218(39), 6898–6906.
- Yisak, H., Redi-Abshiro, M., & Chandravanshi, B. S. (2018). New fluorescence spectroscopic method for the simultaneous determination of alkaloids in aqueous extract of green coffee beans. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1–7.
- Yulius, D. (2018). *Penetapan Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk Murni Robusta Merek “X” dengan Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fase Terbalik*.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal penyusunan naskah skripsi

No	Kegiatan	Des	Jan	Feb	Mar	Apr
1	Penyusunan proposal skripsi					
	a. Bimbingan					
	b. Revisi					
	c. Fixasi proposal skripsi					
2	Seminar proposal skripsi					
3	Tahap penyiapan bahan dan ekstrak					
4	Tahap pelaksanaan penelitian					
	a. Ekstraksi					
	b. Preparasi sampel					
	c. Optimasi kondisi HPLC					
	d. Validasi metode					
	e. Penetapan kadar					
5	Tahap penyusunan hasil skripsi					
6	Seminar hasil skripsi					

Lampiran 2. Surat Hasil Determinasi Tanaman

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



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

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 25/PL17.8/PG/2023

Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi Sarjana Farmasi No: 0547/FIKES.UDS/U/II/2023 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPA. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Retno Eka Lestari
NIM : 19040110
Jur/Fak/PT : Prodi Sarjana Farmasi/ Universitas dr. Soebandi

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub Kelas: Asteridae; Ordo: Rubiales; Famili: Rubiaceae; Genus: Coffea; Spesies: Coffea canephora, Pierre.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 10 Februari 2023
Ka UPA, Pengembangan Pertanian Terpadu

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

Lampiran 3. Certificate of Analysis Caffein



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

Certificate of Analysis

Product Name : Caffeine powder, ReagentPlus®
Product Number : C0750-VAR
Batch Number : 0000181333
Source Batch : 0000179446
CAS Number : 58-08-2
Molecular Formula : C₈H₁₀N₄O₂
Formula Weight : 194.19
Recommended Retest Date : May 2026
Quality Release Date : 20 Jun 2022

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



Pramod Kadam(PhD), Manager
Analytical
Bangalore
IN

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

Version Number: 01 Doc: 1084343

Page 1 of 1

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



Lampiran 4. Rendemen Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta

A. Rendemen Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta

Replikasi	Bobot sampel	Bobot ekstrak kental	Bobot rendemen
Replikasi 1	200,02 gram	24,65 gram	12,32%
Replikasi 2	200,04 gram	25,75 gram	12,87%
Replikasi 3	200,03 gram	25,72 gram	12,85%
	rata-rata = 200,03 gram	rata-rata = 25,70 gram	rata-rata = 12,68%

Replikasi 1 :

$$\begin{aligned}\text{Persentase rendemen} &= \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{24,65}{200,02} \times 100 \\ &= 12,32\%\end{aligned}$$

Replikasi 2 :

$$\begin{aligned}\text{Persentase rendemen} &= \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{25,75}{200,04} \times 100 \\ &= 12,87\%\end{aligned}$$

Replikasi 3 :

$$\begin{aligned}\text{Persentase rendemen} &= \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{25,72}{200,03} \times 100 \\ &= 12,85\%\end{aligned}$$

$$\text{Persentase rendemen rata-rata : } \frac{12,32+12,87+12,85}{3} = 12,68\%$$



Ekstraksi maserasi replikasi 1



Ekstraksi maserasi replikasi 2



Ekstraksi maserasi replikasi 3



Hasil ekstrak kental

Lampiran 5. Dokumentasi proses penyerbukan kopi robusta





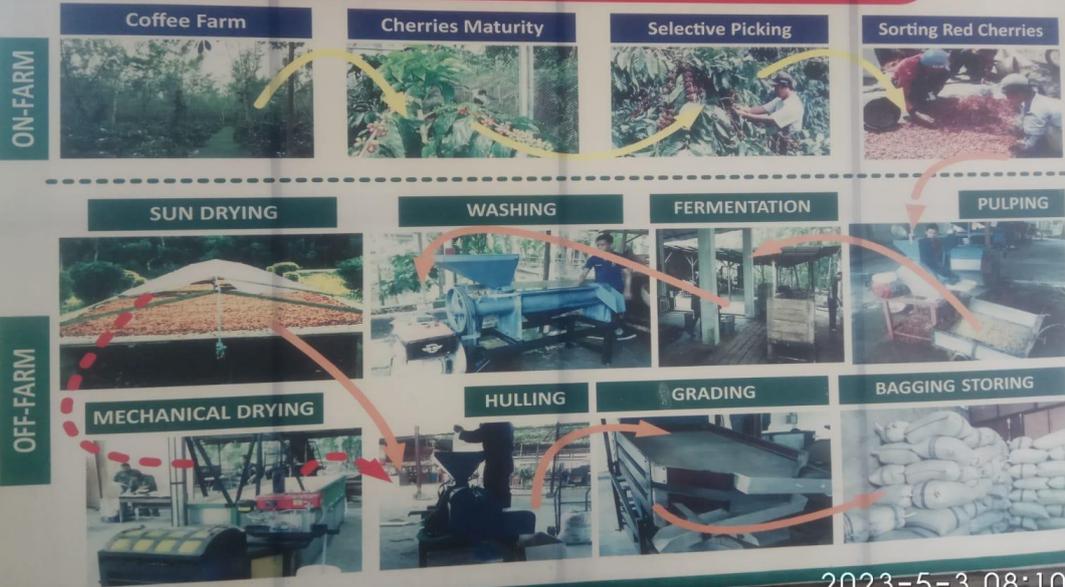


INDONESIAN COFFEE AND COCOA RESEARCH INSTITUTE (ICCRI)

Jl. PB. Sudirman No. 90 Jember 68118, East Java
Telp. (0331) 757 130, 757 132, 757 191 | Email : iccri@iccri.net website : www.iccri.net

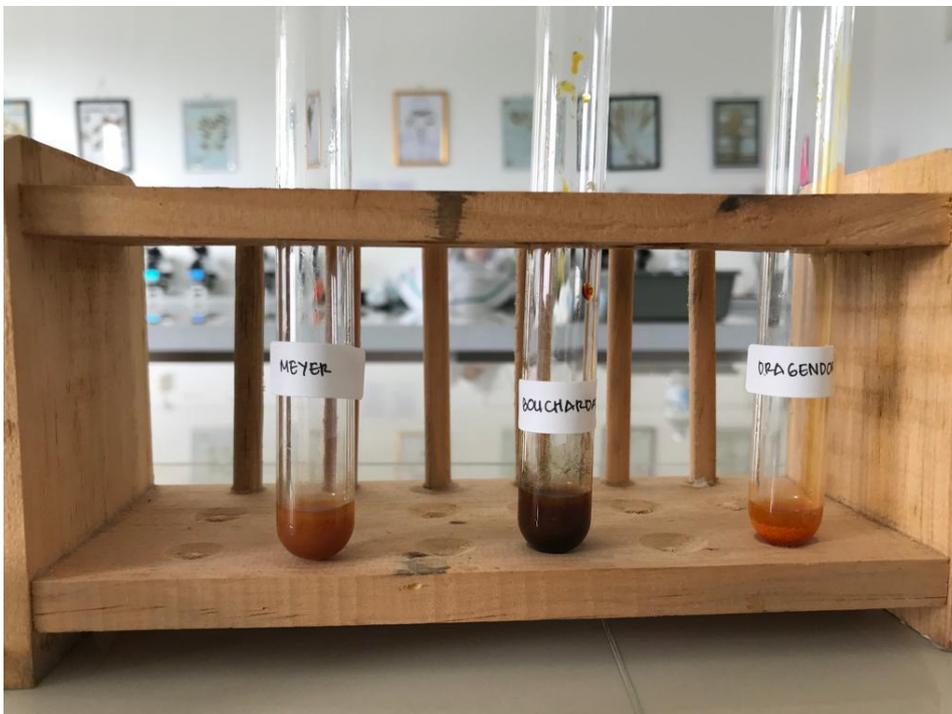
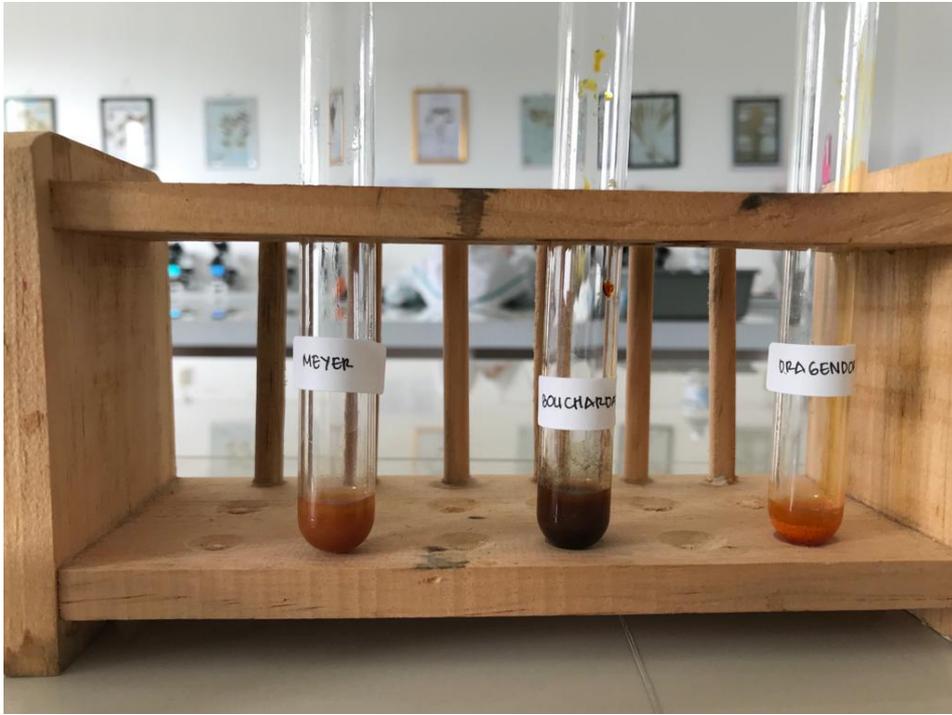


ON – OFF FARM LINKAGE



2023-5-3 08:10

Lampiran 6. Identifikasi senyawa alkaloid



Lampiran 7. Perhitungan pembuatan larutan baku kafein

$$\text{ppm} = \text{mg} / \text{mL} \times 1000$$

$$\text{ppm} = 25 \text{ mg} / 50 \text{ mL} \times 1000$$

$$= 500 \text{ ppm}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\text{mL} \times 1000 \text{ ppm} = 50 \text{ mL} \times 100 \text{ ppm}$$

$$\text{mL} = 50 \text{ mL} / 1000 \text{ ppm} \times 100 \text{ ppm}$$

$$= 5 \text{ mL}$$

Lampiran 8. Perhitungan linieritas, LOD dan LOQ

A. Pembuatan larutan standar kafein

$$\text{ppm} = \text{mg} / \text{mL} \times 100$$

$$100 \text{ ppm} = \text{mg} / 50 \text{ mL} \times 1000$$

$$= 5 \text{ mg}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

- 5 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 5 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 0,5$$

- 10 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 10 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 1$$

- 20 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 20 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 2$$

- 30 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 30 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 3$$

- 40 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 40 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 4$$

- 50 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 50 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 5$$

- 80 ppm $\rightarrow \text{mL} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 80 \text{ ppm}$

$$\text{mL} = 8$$

Lampiran 9. Perhitungan penentuan presisi dan akurasi

Konsentrasi yang diperoleh $3106.092937 \text{ mg/L} \times 0.01 \text{ L} = 31,06092 \text{ mg}$

$\% \text{ b/b} = \text{konsentrasi kafein (mg)} / \text{konsentrasi sampel (mg)} \times 100\%$

$$= 31,06092 \text{ mg} / 10 \text{ mg} \times 100\%$$

$$= 3,106092 \% \text{ b/b}$$

Sampel ekstrak etanol biji kopi robusta :

$50 \text{ ppm} = \text{mg} / 100 \text{ mL} \times 1000 \text{ ppm}$

$$= 5 \text{ mg}$$

Baku standar kafein :

- Standar adisi 80% : $80 / 100 \times 3,1 \text{ mg} = 2,48 \text{ mg}$
- Standar adisi 100% : $100 / 100 \times 3,1 \text{ mg} = 3,1 \text{ mg}$
- Standar adisi 120% : $120 / 100 \times 3,1 \text{ mg} = 37,2 \text{ mg}$

Lampiran 10. Perhitungan validasi metode akurasi dan presisi

AKURASI

Konsentrasi 80%

$$\text{Replikasi 1} = 6.96896 - 4.4888 / 2.48 \times 100\% = 100.00524\%$$

$$\text{Replikasi 2} = 6.81365 - 4.4888 / 2.48 \times 100\% = 93.74274\%$$

$$\text{Replikasi 3} = 6.63632 - 4.4888 / 2.48 \times 100\% = 86.59233\%$$

$$\text{Rata - rata recovery} = 93.44677 \text{ (memenuhi)}$$

Konsentrasi 100%

$$\text{Replikasi 1} = 7.3784 - 4.4888 / 3.1 \times 100\% = 93,21193\%$$

$$\text{Replikasi 2} = 7.4132 - 4.4888 / 3.1 \times 100\% = 94.33451\%$$

$$\text{Replikasi 3} = 7.4154 - 4.4888 / 3.1 \times 100\% = 94.40548\%$$

$$\text{Rata - rata recovery} = 93.98397 \text{ (memenuhi)}$$

Konsentrasi 120%

$$\text{Replikasi 1} = 8.47449 - 4.4888 / 3.72 \times 100\% = 107.14147\%$$

$$\text{Replikasi 2} = 8.48829 - 4.4888 / 3.72 \times 100\% = 107.51257\%$$

$$\text{Replikasi 3} = 8.73616 - 4.4888 / 3.72 \times 100\% = 114.17568\%$$

$$\text{Rata - rata recovery} = 109.60991 \text{ (memenuhi)}$$

PRESISI

Konsentrasi 80%

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

$$SD = \frac{\sqrt{0.061582}}{6-2}$$

$$SD = 0.12407$$

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

$$\%KV = 0.12407 / 6.95629$$

$$\%KV = 0.015673$$

Konsentrasi 100%

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

$$SD = \frac{\sqrt{0.19287}}{6-2}$$

$$SD = 0.21958$$

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

$$\%KV = 0.21958 / 7.79140$$

$$\%KV = 0.02773$$

Konsentrasi 100%

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

$$SD = \frac{\sqrt{0.23323}}{6-2}$$

$$SD = 0.24147$$

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

$$\%KV = 0.24147 / 8.98711$$

$$\%KV = 0.03050$$

Lampiran 11. Perhitungan penetapan kadar alkaloid

$$Y = 808.88x - 524.84$$

Replikasi 1 :

$$2845.92627 = 808.88x - 524.84$$

$$X = 2845.92627 + 524.84 / 808.88x$$

$$X = 4.1672019$$

$$\text{Alkaloid total} = 4.1672019 \mu\text{g/mL} \times 100 \text{ mL} \times 10 / 5 \text{ mg}$$

$$\text{Alkaloid total} = 412.594247 \mu\text{g/mg} \text{ --- } 0,412594247 \text{ mg/g}$$

$$\text{Ppm} = 0,412594247 / 100 \text{ mL} \times 1000 = 4.12594247 \text{ ppm}$$

Replikasi 2 :

$$3160.00293 = 808.88x - 524.84$$

$$X = 3160.00293 + 524.84 / 808.88x$$

$$X = 4.55548775$$

$$\text{Alkaloid total} = 4.55548775 \mu\text{g/mL} \times 100 \text{ mL} \times 10 / 5 \text{ mg}$$

$$\text{Alkaloid total} = 451.038391 \mu\text{g/mg} \text{ --- } 0,451038391 \text{ mg/g}$$

$$\text{Ppm} = 0,451038391 / 100 \text{ mL} \times 1000 = 4.51038391 \text{ ppm}$$

Replikasi 3 :

$$3312.34961 = 808.88x - 524.84$$

$$X = 3312.34961 + 524.84 / 808.88x$$

$$X = 4.74383049$$

$$\text{Alkaloid total} = 4.74383049 \mu\text{g/mL} \times 100 \text{ mL} \times 10 / 5 \text{ mg}$$

$$\text{Alkaloid total} = 474,383049 \mu\text{g/mg} \text{ --- } 0,474383049 \text{ mg/g}$$

$$\text{Ppm} = 0,474383049 / 100 \text{ mL} \times 1000 = 4.74383049 \text{ ppm}$$

Rata – rata kadar alkaloid :

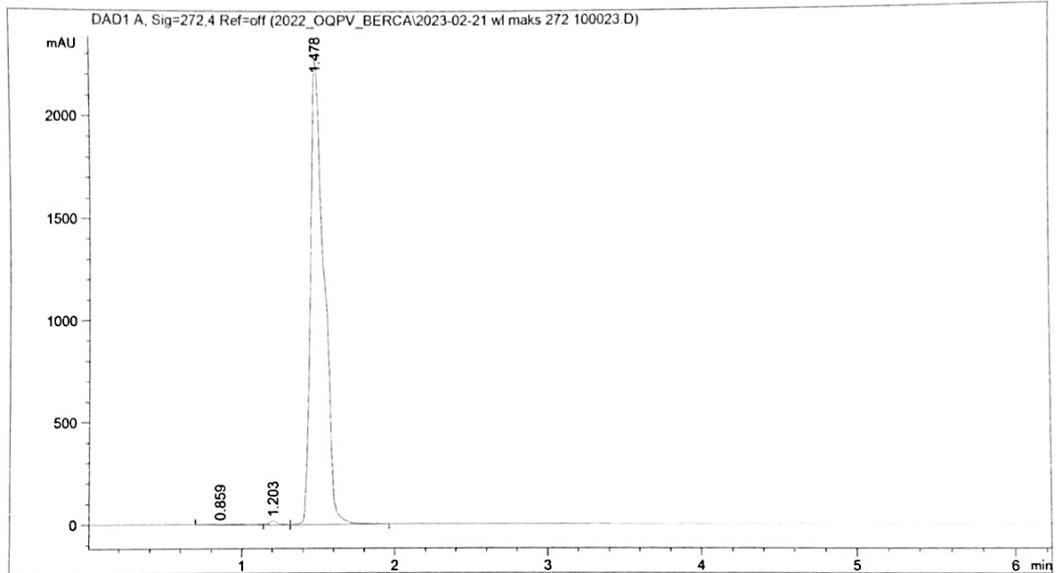
$$4,12594247 + 4.51038391 + 4.74383049 / 3 = 4.46005229 \text{ ppm}$$

$$SD = 0,441239$$

$$\text{Rata – rata kadar alkaloid} + SD \text{ --- } 4,46005229 + 0,441239 = 4,90129129$$

$$\text{Rata – rata kadar alkaloid} - SD \text{ --- } 4,46005229 - 0,441239 = 4,01881329$$

Lampiran 12. Kromatogram dan data optimasi laju alir

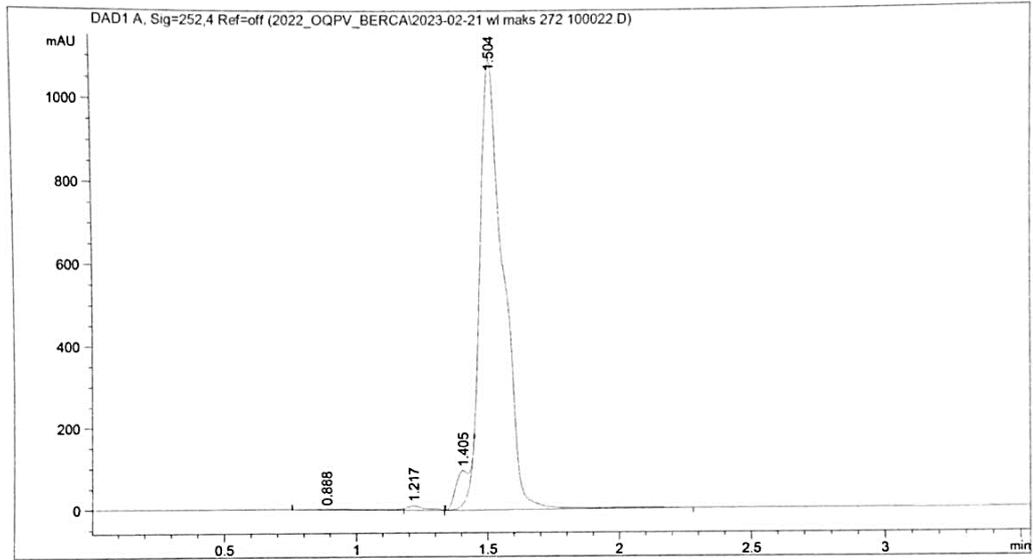


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
0.859	-	21.57839	1.45995	0.44	0.2631	60	-	-
1.203✓	-	80.64314	18.13713	3.69	0.0520	2963	1.28✓	1.40
1.478	-	1.39433e4	2281.41699	0.51✓	0.1016	1169✓	2.11	1.23

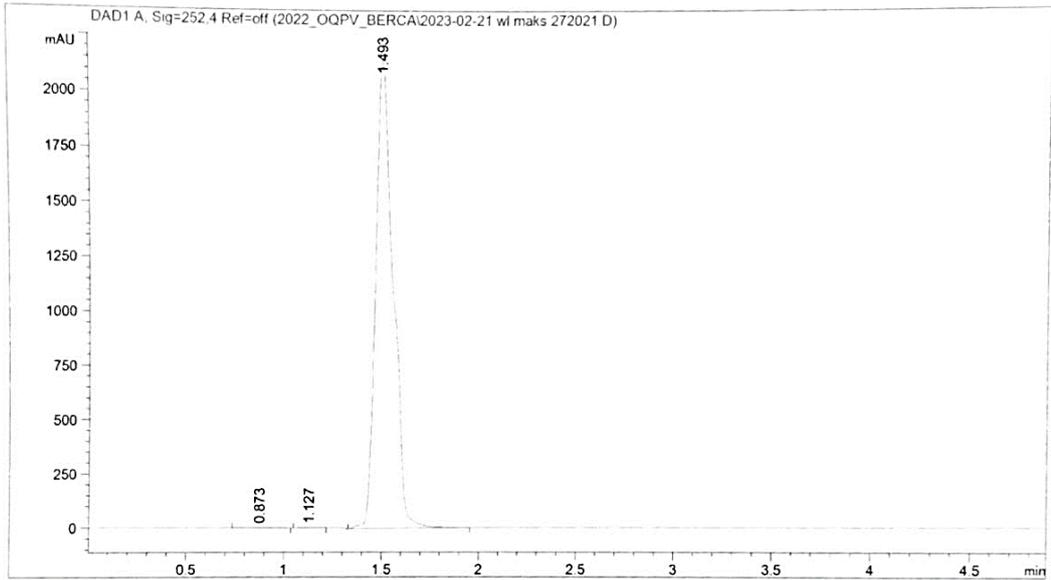


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=252,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
0.888	-	24.23786	1.53100	0.32	0.2050	104	-	-
1.217	-	53.95414	10.97895	5.74	0.0587	2379	1.47	1.37
1.405	-	270.15799	82.67266	1.60	0.0722	2089	1.69	1.15
1.504	-	6839.39941	1098.34949	0.66	0.1005	1237	0.67	1.07



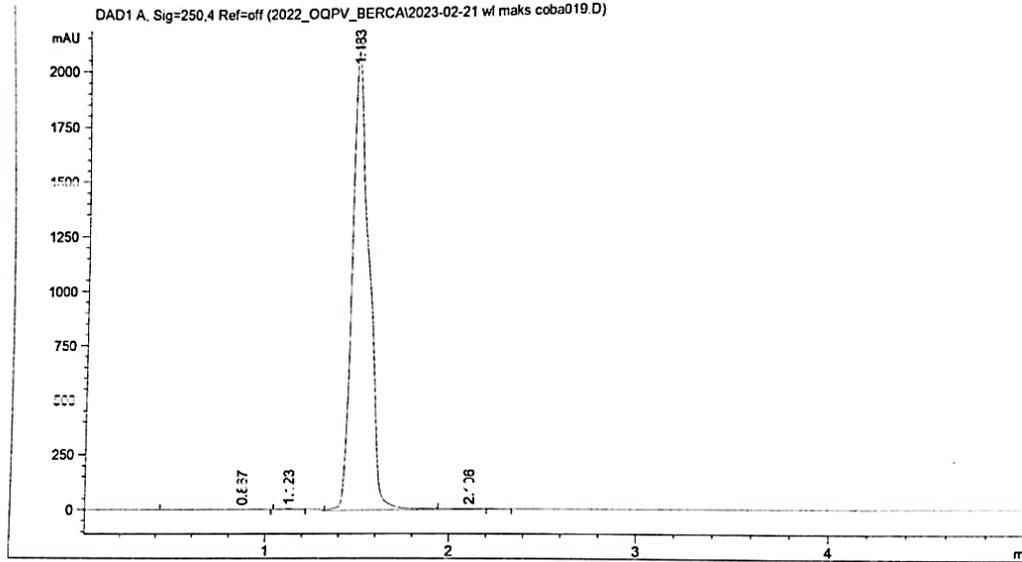
=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=252,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Selectivity
0.873	-	9.85870	1.17588	0.83	0.1352	232	-	-
1.127	-	6.58216	1.76755	0.87	0.0593	2006	1.53	1.29
1.493	-	1.33188e4	2157.00464	0.51	0.0952	1368	2.78	1.32

Lampiran 13. Kromatogram dan data fase gerak

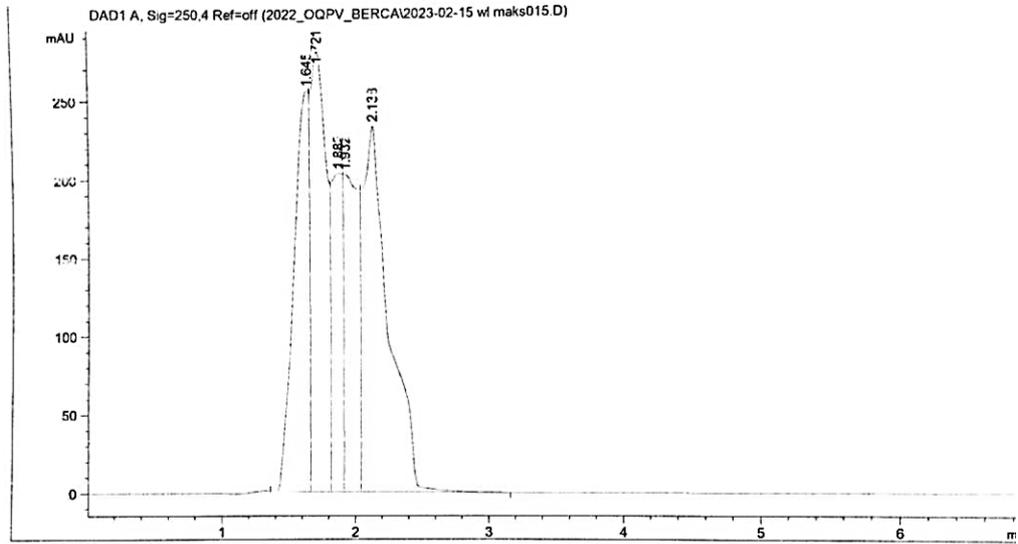


=====
Area Percent Report with Performance
 =====

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

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

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Selectivity
0.857	-	15.05299	1.05437	1.97	0.1950	109		
1.123	-	5.13993	1.27818	0.80	0.0647	1668	1.15	1.29
1.183	-	1.3255384	2005.67201	0.46	0.1033	1130	2.51	1.32
2.106	-	10.24998	1.19177	1.96	0.1613	946	2.76	1.42

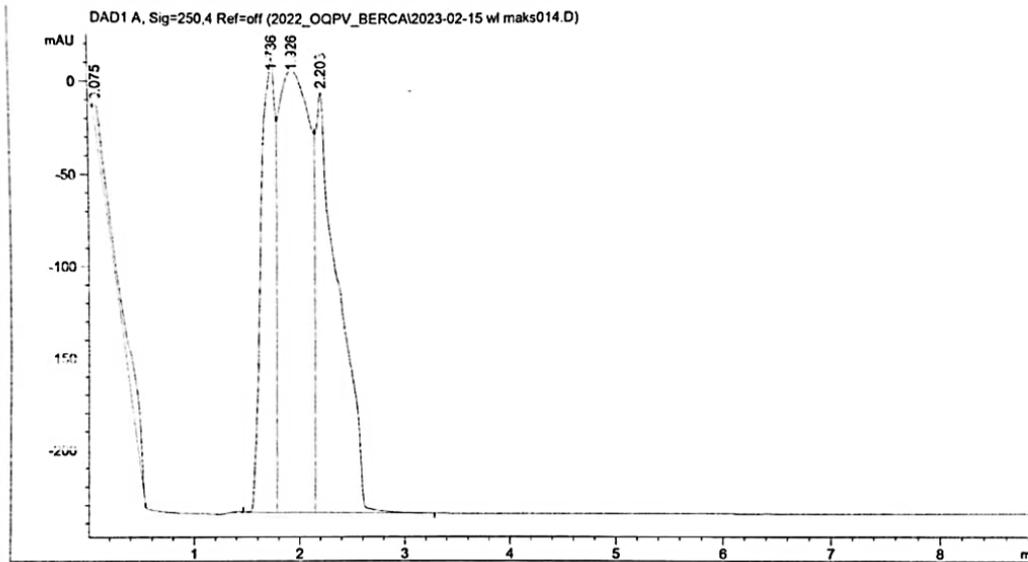


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

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

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
1.645	-	2063.00356	255.32367	6.19	0.1316	905		
1.721	-	2266.63672	279.99811	0.65	0.1525	707	0.31	1.05
1.882	-	1100.74792	203.15075	2.00	0.0962	2120	0.70	1.02
1.932	-	1529.99573	202.51076	0.16	0.1290	1204	0.25	1.03
2.138	-	3130.19897	233.18152	0.57	0.1870	718	0.77	1.11



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

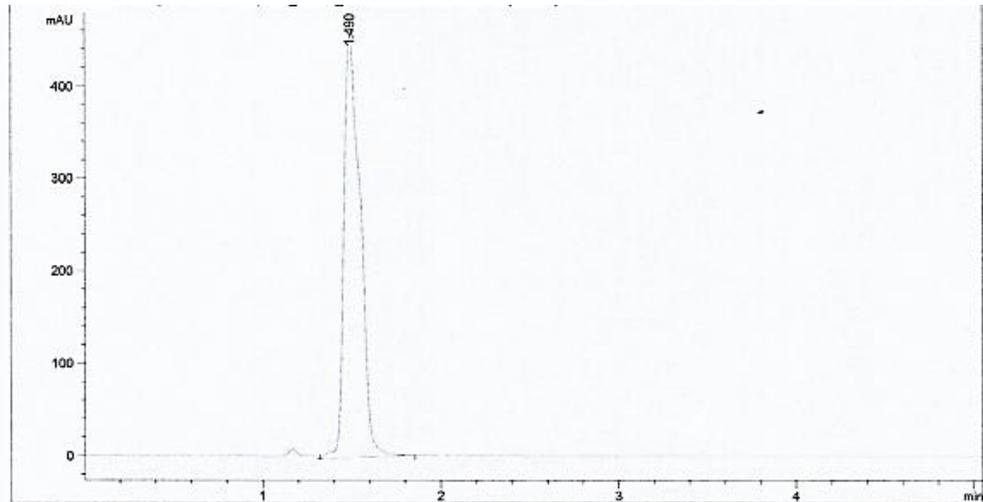
Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

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

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
0.075	-	100.49047	13.00939	0.03	-	-	-	-
1.736	-	2299.59351	247.22908	2.60	0.1606	647	-	23.27
1.926	-	4023.67000	240.52110	0.03	0.3004	150	0.40	1.11
2.203	-	3483.61353	228.73570	0.25	0.2543	415	0.53	1.14

Lampiran 14. Kromatogram dan data validasi metode

1. Selektivitas

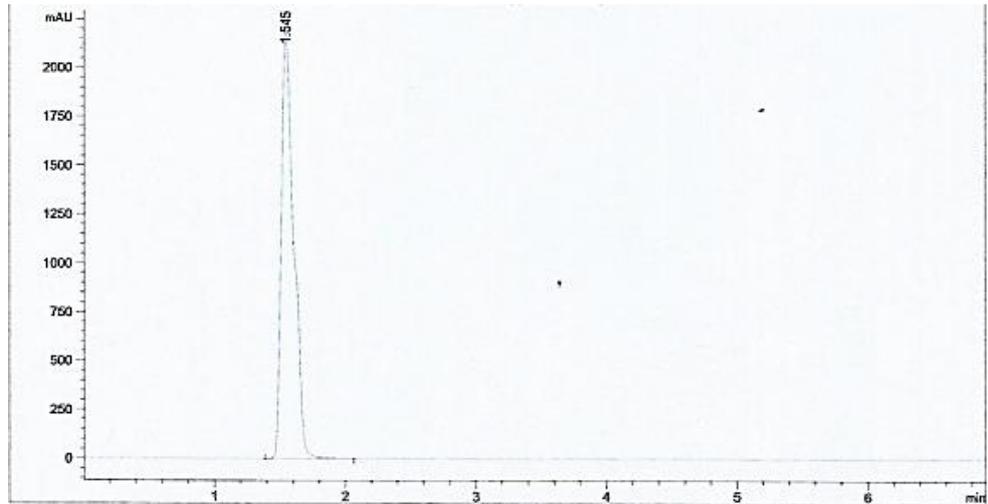


```
=====
                          Area Percent Report with Performance
=====
```

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
1.490	-	2907.76050	457.89850	0.51	0.1074	1066	-	-

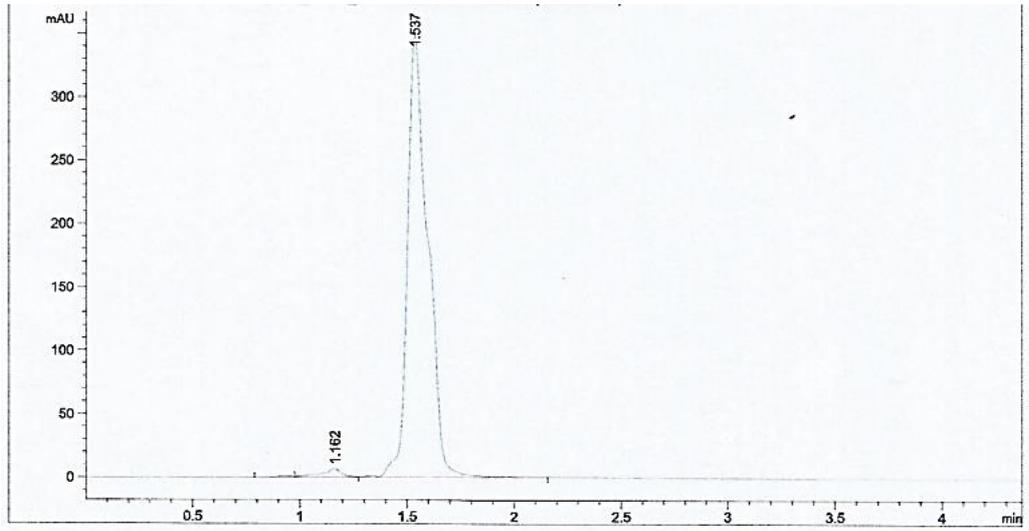


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
1.545	-	1.44056e4	2191.40405	0.51	0.0993	1336	-	-

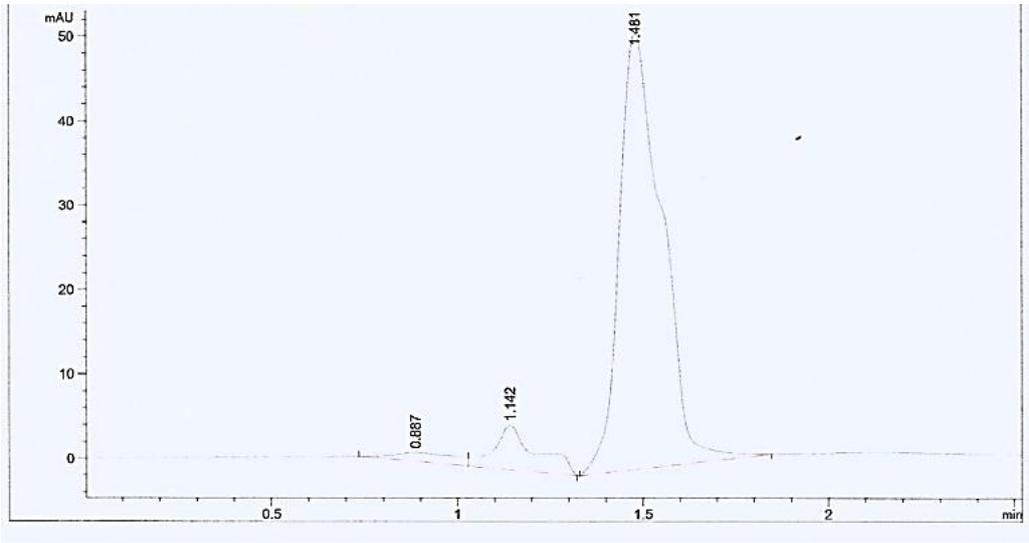


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
1.162	-	46.81740	6.94397	1.95	0.0733	1391	-	-
1.537	-	2333.51221	349.50278	0.63	0.1086	1108	2.42	1.32



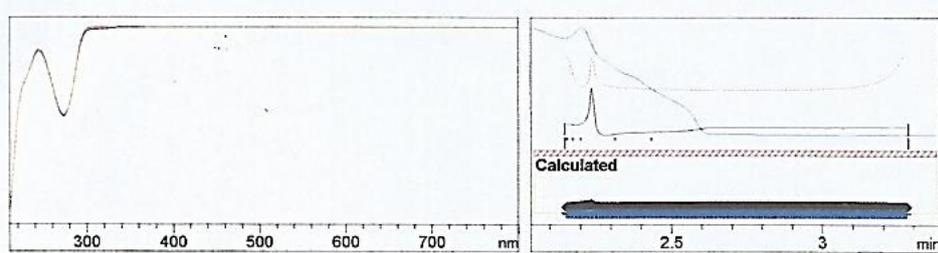
=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

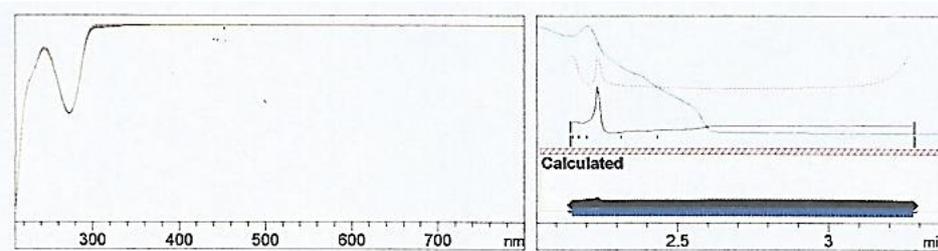
RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
0.887	-	13.04492	1.08886	0.50	0.2689	60	-	-
1.142	-	42.82285	5.33540	0.56	0.0785	1171	0.86	1.29
1.481	-	413.90451	51.72998	0.57	0.1347	671	1.87	1.30

2. Purity factor



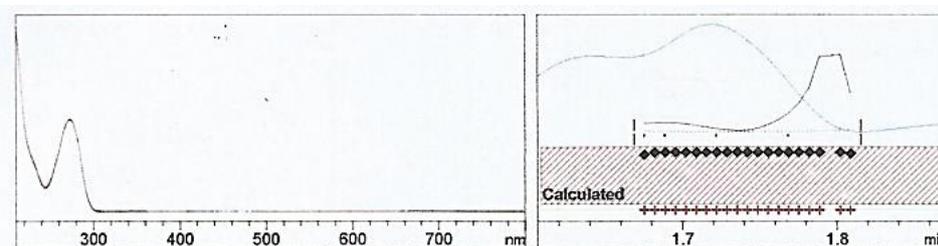
-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 998.693 (169 of 169 spectra are within the calculated threshold limit.)
 Threshold : 885.262 (Calculated with 169 of 169 spectra)
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (2.148 / 3.282)
 Spectra : 5 (Selection automatic, 5)
 Noise Threshold: 4.063 (12 spectra, St.Dev 1.4554 + 3 * 0.8693)
 Warning : Calculated Noise Level > 1.00 (see information in threshold calculation)



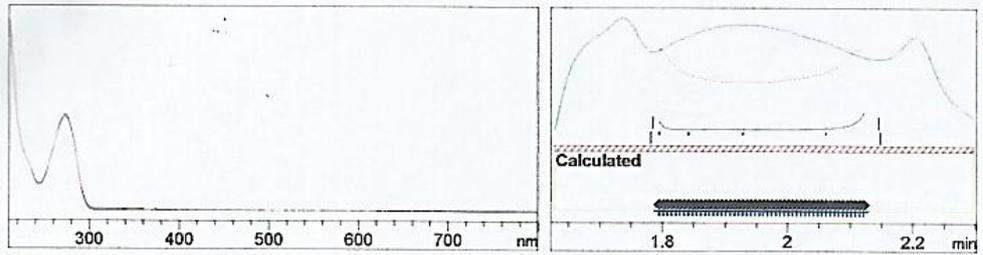
-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 998.693 (169 of 169 spectra are within the calculated threshold limit.)
 Threshold : 885.262 (Calculated with 169 of 169 spectra)
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (2.148 / 3.282)
 Spectra : 5 (Selection automatic, 5)
 Noise Threshold: 4.063 (12 spectra, St.Dev 1.4554 + 3 * 0.8693)
 Warning : Calculated Noise Level > 1.00 (see information in threshold calculation)



-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

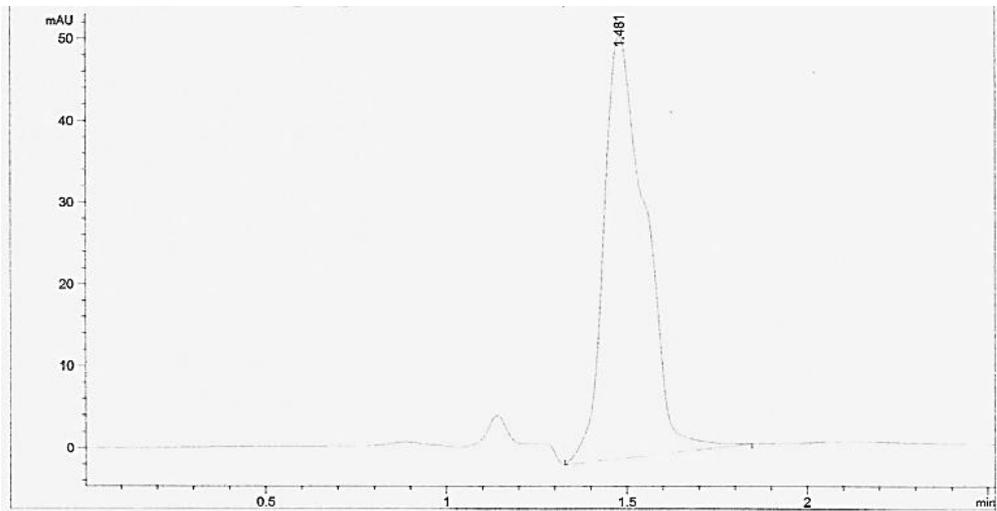
Purity factor : 999.080 (20 of 20 spectra exceed the calculated threshold limit.)
 Threshold : 999.996 (Calculated with 20 of 20 spectra)
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (1.669 / 1.815)
 Spectra : 4 (Selection automatic, 5)
 Noise Threshold: 0.009 (12 spectra, St.Dev 0.0045 + 3 * 0.0015)



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

Purity factor : 999.886 (50 of 50 spectra are within the calculated threshold limit.)
 Threshold : 801.169 (Calculated with 50 of 50 spectra)
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (1.782 / 2.148)
 Spectra : 4 (Selection automatic, 5)
 Noise Threshold: 4.063 (12 spectra, St.Dev 1.4554 + 3 * 0.8693)
 Warning : Calculated Noise Level > 1.00 (see information in threshold calculation)

3. Linieritas, LOD & LOQ

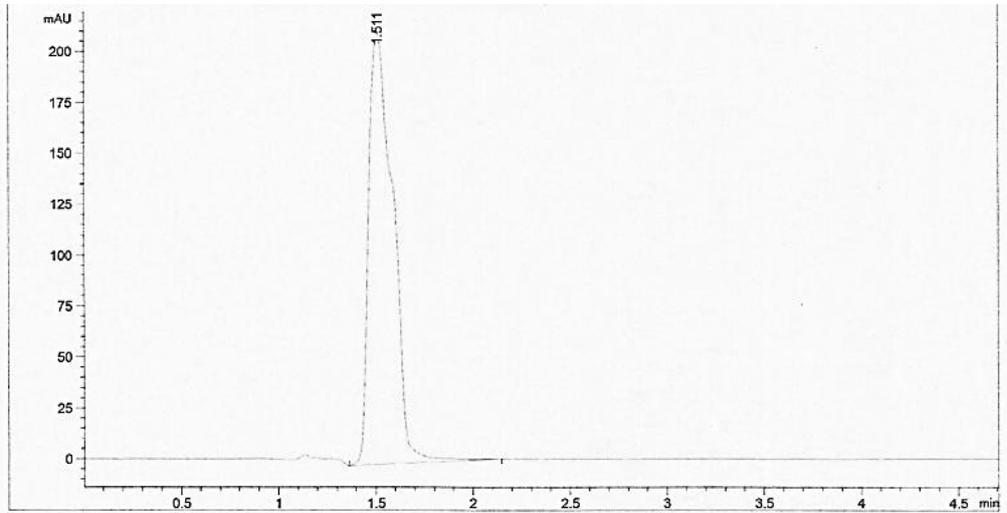


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
								ution ivity
1.481	-	413.90451	51.72998	0.57	0.1347	671	-	-

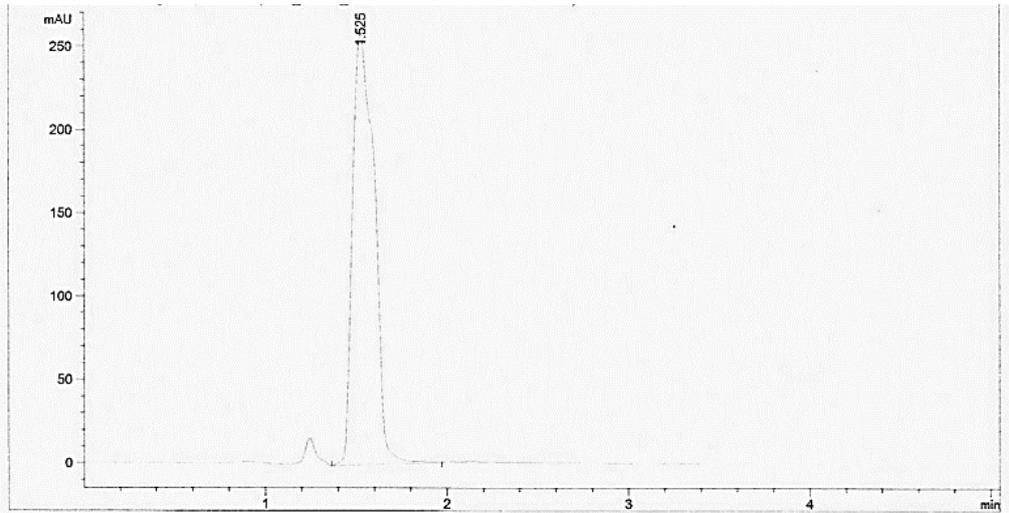


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.511	-	1834.52454	211.93346	0.52	0.1512	552	-	-

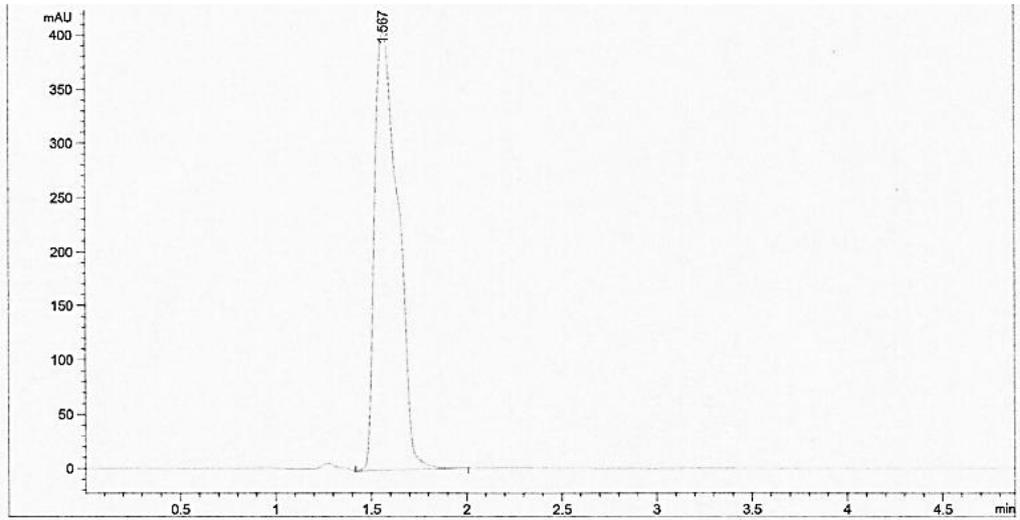


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.525	-	2149.08472	258.89438	0.56	0.1428	629	-	-

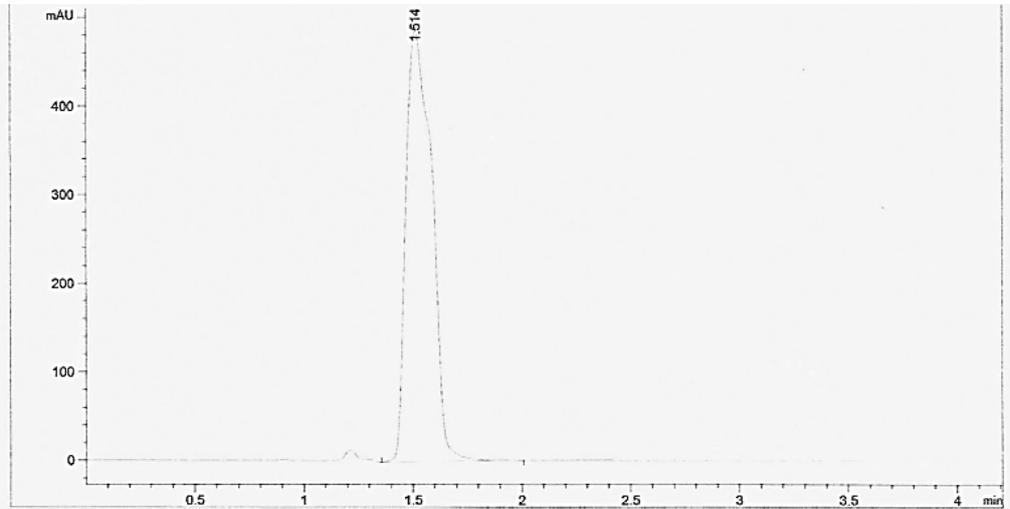


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
								ution ivity
1.567	-	3435.10913	404.80429	0.54	0.1505	602	-	-

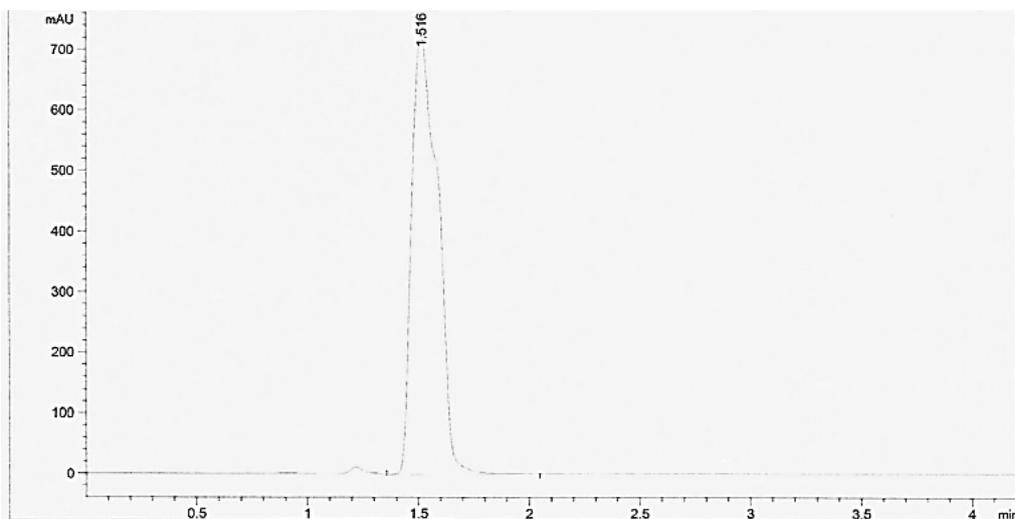


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.514	-	4042.26782	488.01022	0.55	0.1428	624	-	-

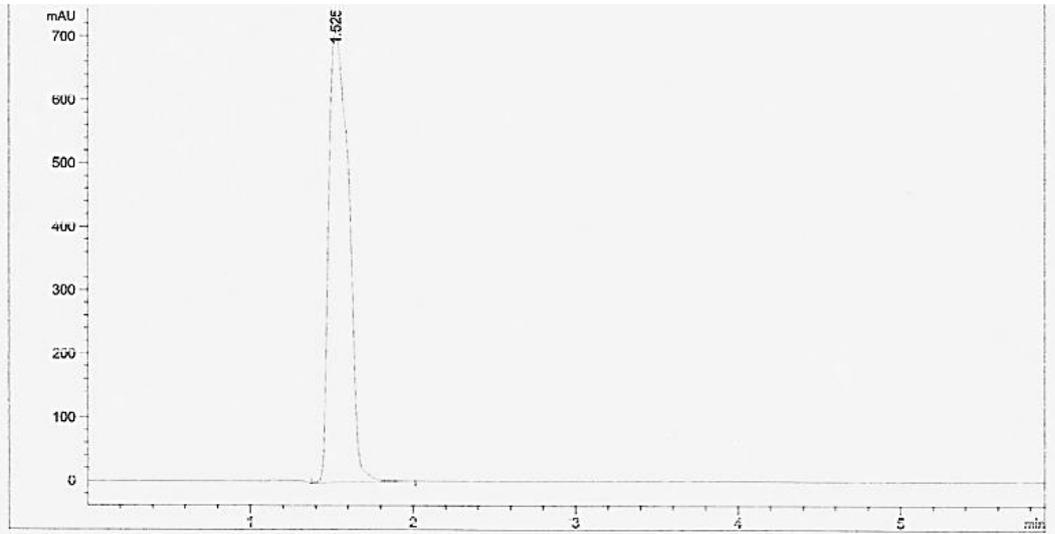


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.516	-	5965.91064	726.47656	0.56	0.1448	607	-	-



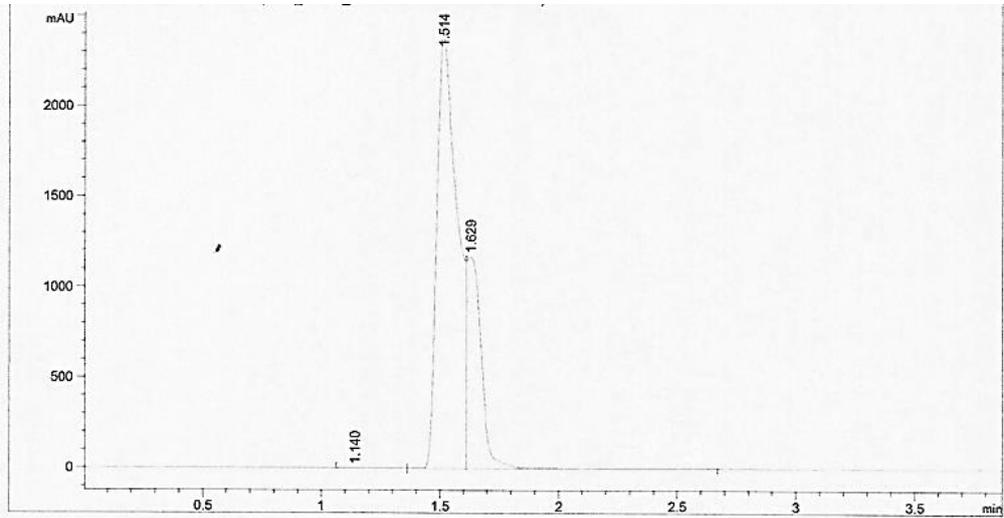
=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig-272,4 Ref-off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.525	-	6042.13867	711.15851	0.52	0.1456	605	-	-

4. Akurasi

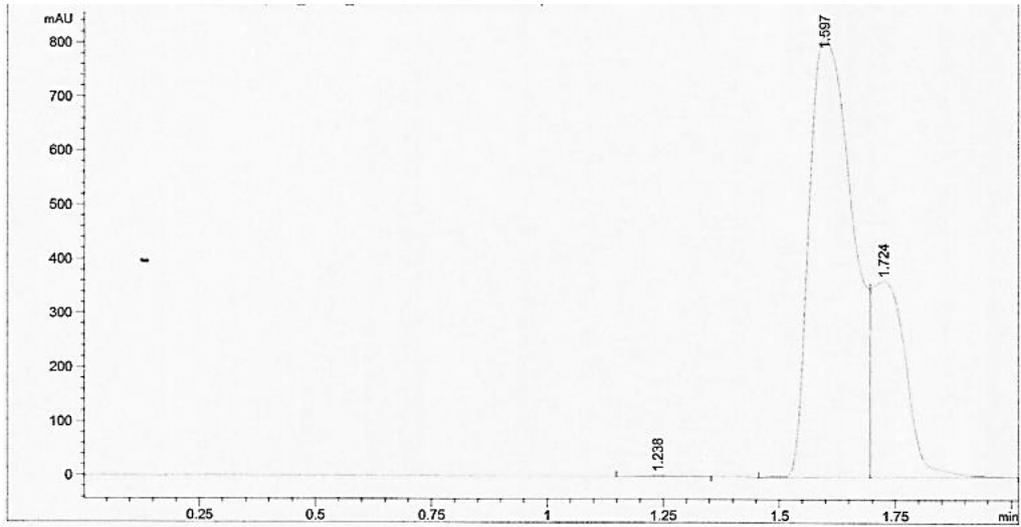


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.140	-	19.08968	1.17325	0.15	0.2320	134	-	-
1.514	-	1.42288e4	2408.44165	0.47	0.1128	1001	1.27	1.33
1.629	-	5002.13867	1174.15393	0.35	0.0661	3362	0.76	1.08

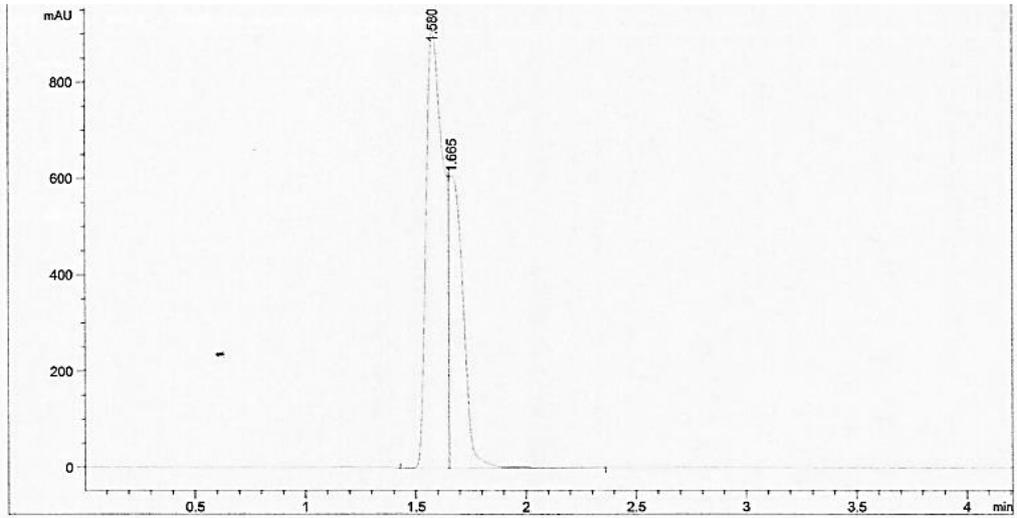


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
1.238	-	5.99372	1.10413	0.68	0.0993	858	-	-
1.597	-	5259.26270	816.56775	0.53	0.1088	1192	2.03	1.29
1.724	-	1850.13391	363.25479	0.48	0.0816	2467	0.79	1.08

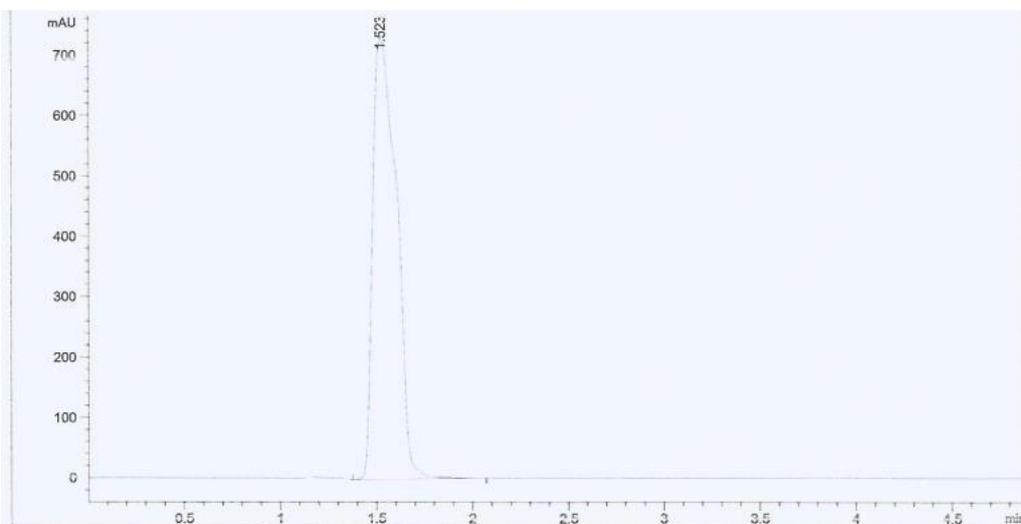


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.580	-	5000.95215	911.46741	0.58	0.1054	1249	-	-
1.665	-	2685.81274	607.91919	0.21	0.0694	3103	0.57	1.05

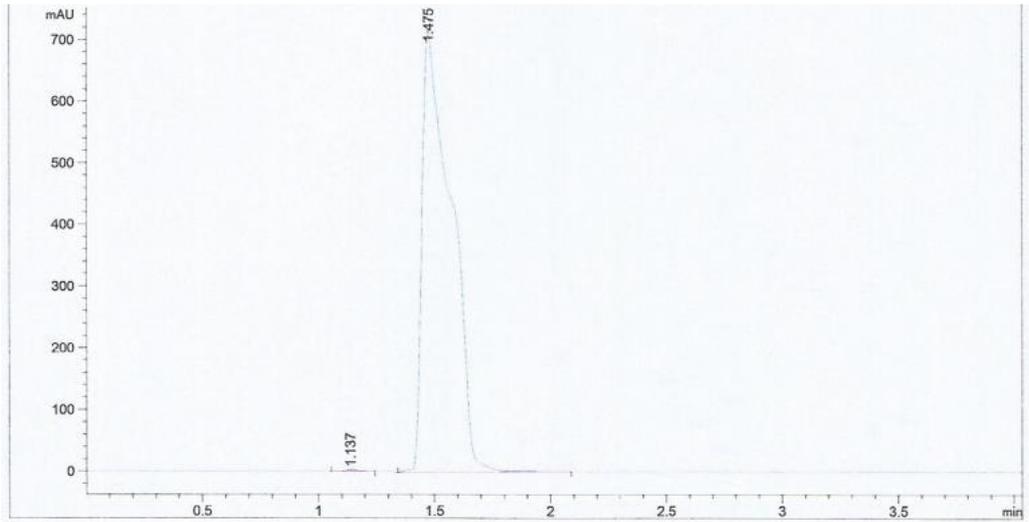


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig-272,4 Ref-off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.523	-	6280.02686	731.31537	0.47	0.1495	574	-	-

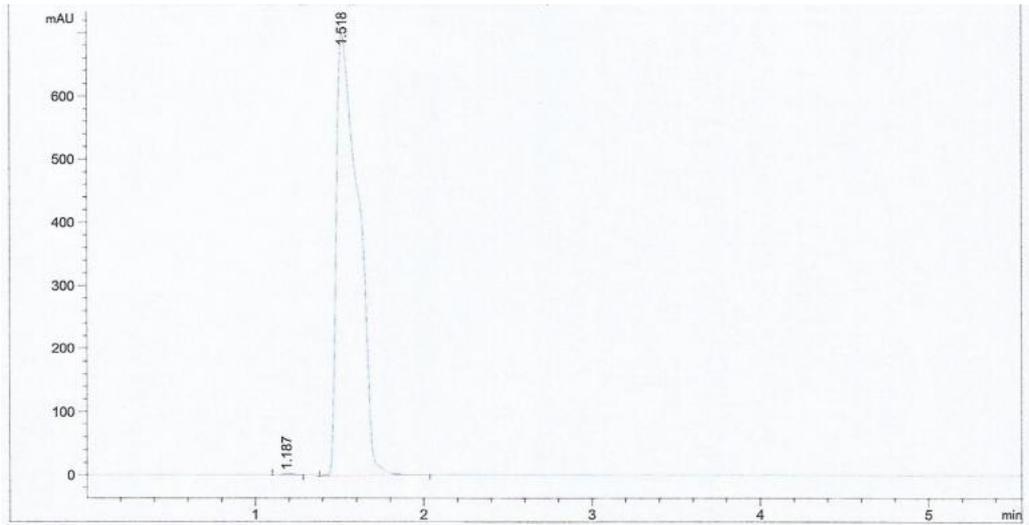


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
1.137	-	7.70479	1.76993	0.62	0.0775	1189	-	-
1.475	-	6250.80713	717.26385	0.26	0.1667	434	1.63	1.30

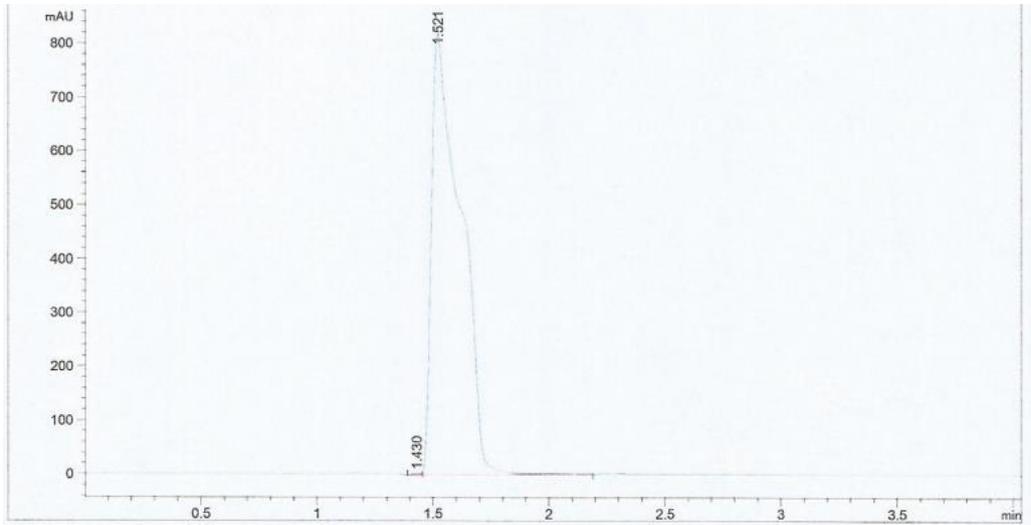


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm. [min]	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
1.187	-	8.71354	2.07073	0.70	0.0717	1524	-	-
1.518	-	6278.28613	701.93359	0.31	0.1654	469	1.64	1.28

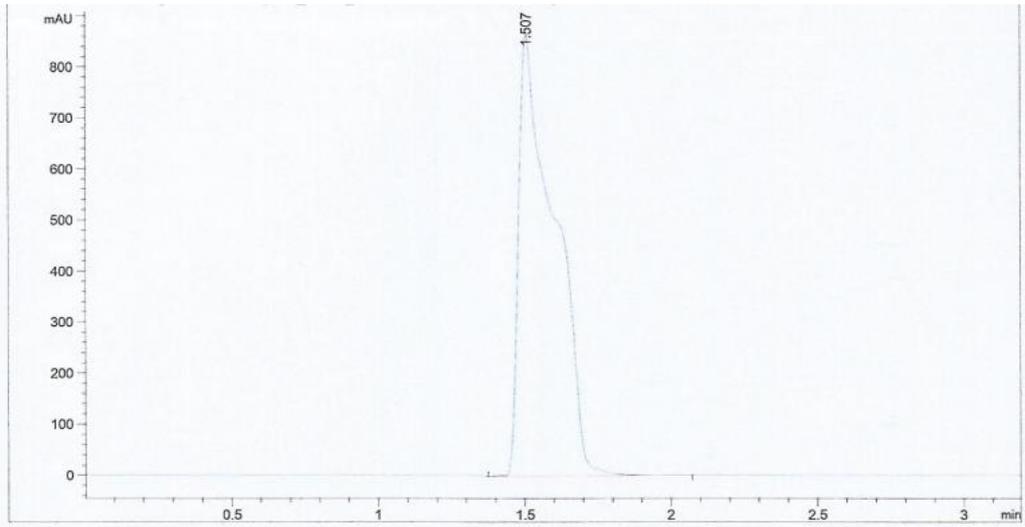


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.430	-	5.23590	2.31073	1.51	0.0474	5032	-	-
1.521	-	7129.40088	823.62634	0.26	0.1671	460	0.50	1.06

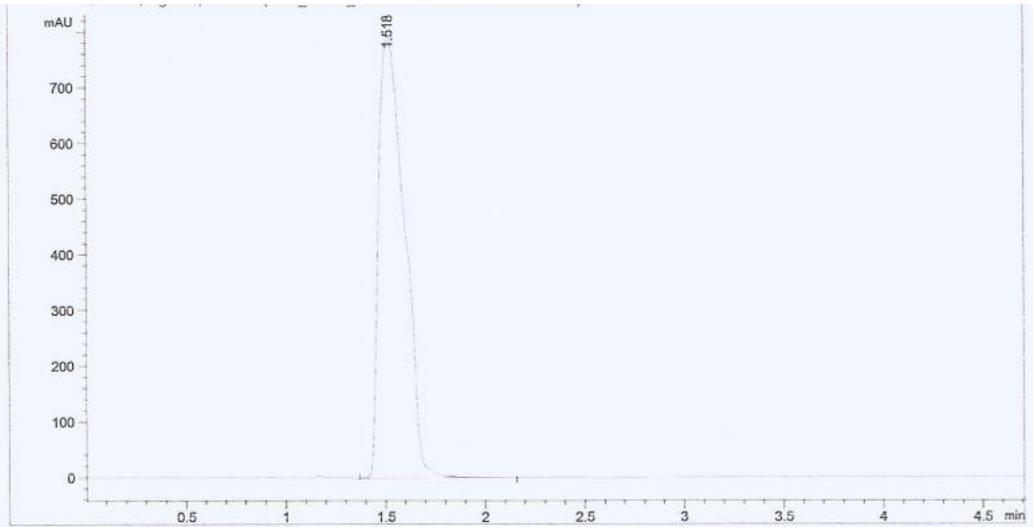


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.507	-	7325.62549	867.53979	0.25	0.1675	450	-	-



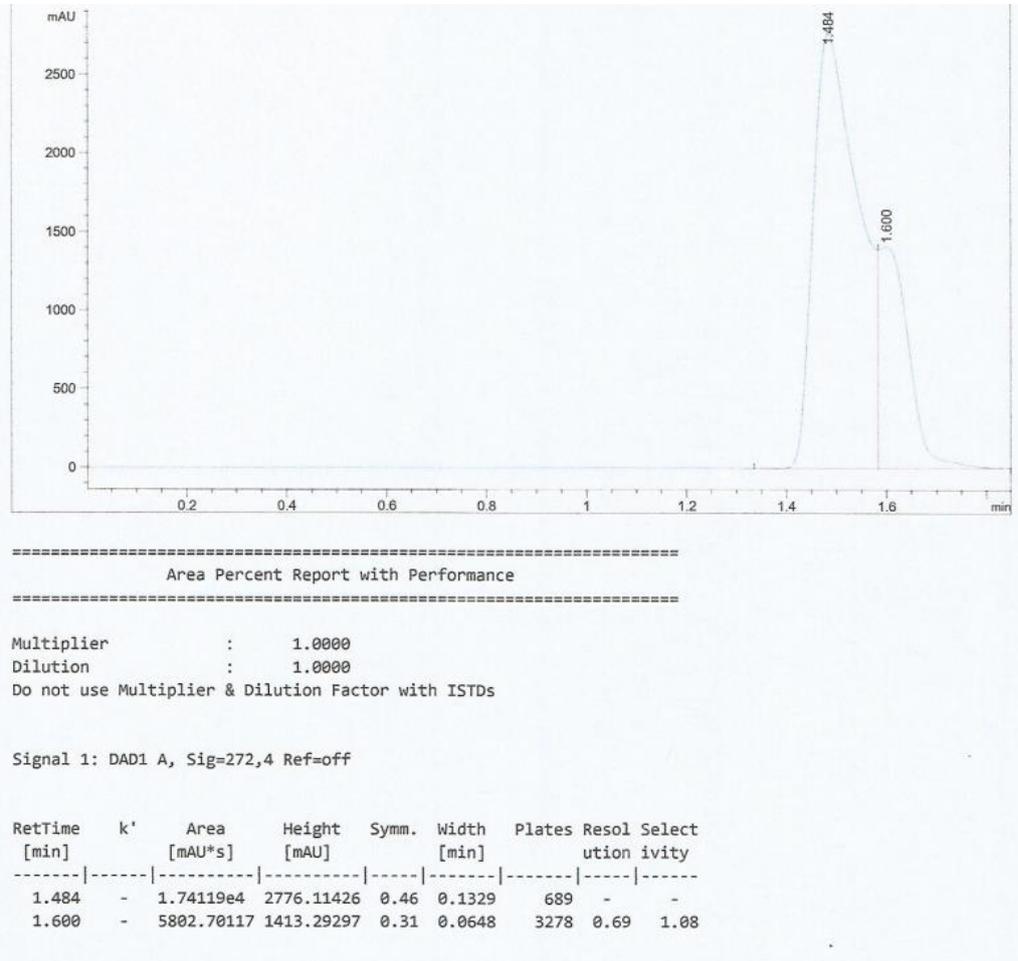
=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

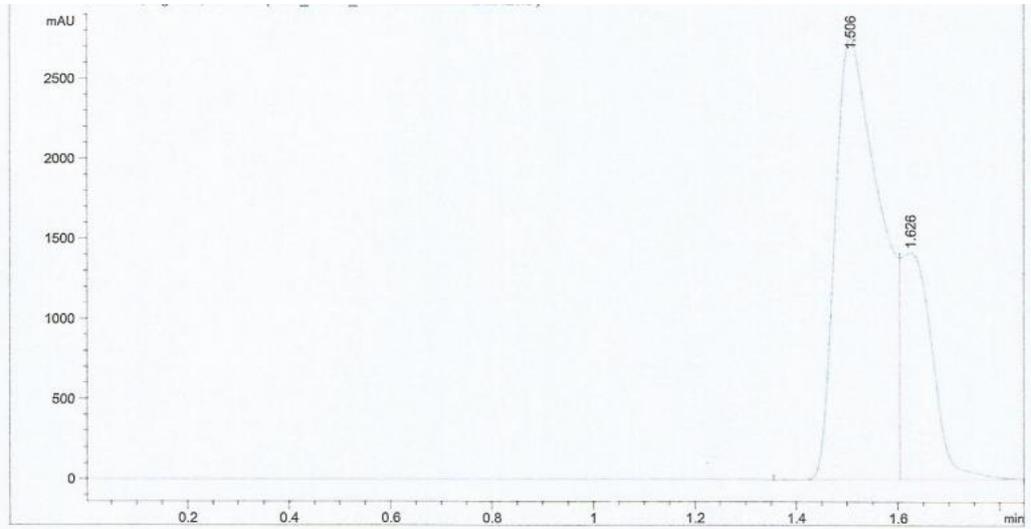
Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.518	-	7118.47217	793.78082	0.53	0.1531	543	-	-

5. Presisi konsentrasi 80%



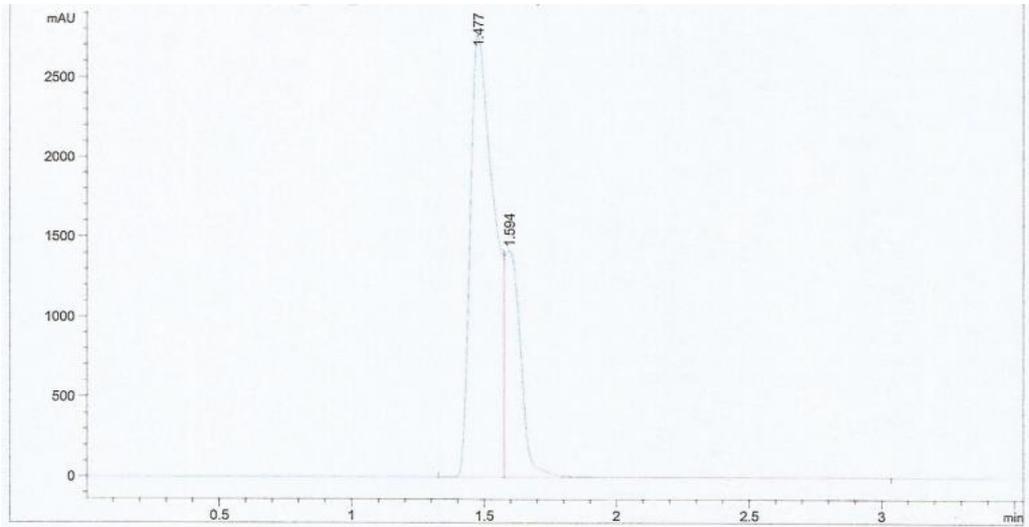


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
1.506	-	1.71832e4	2770.76050	0.47	0.1312	733	-	-
1.626	-	5989.41113	1420.02942	0.40	0.0670	3251	0.71	1.08

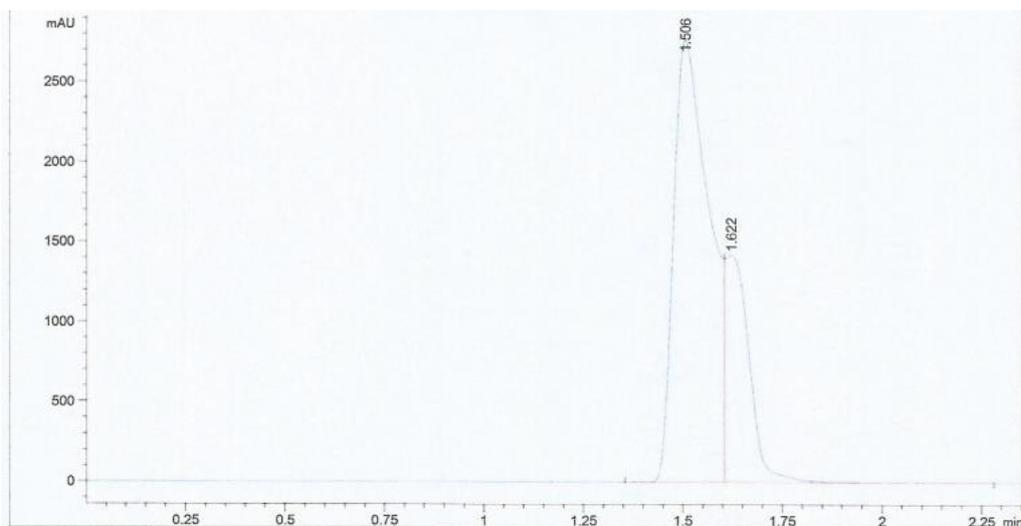


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
1.477	-	1.72921e4	2778.18872	0.47	0.1320	691	-	-
1.594	-	6028.64014	1418.36304	0.34	0.0659	3246	0.70	1.08

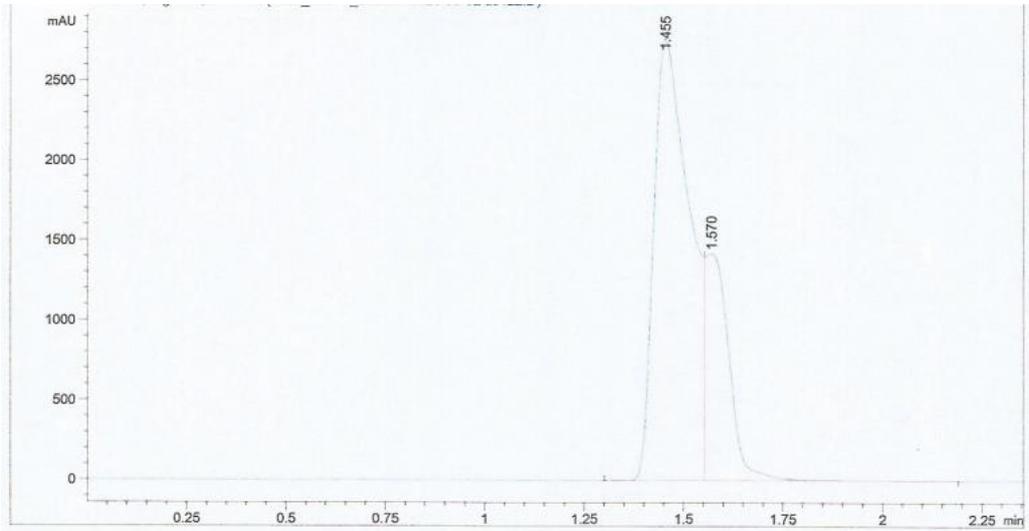


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.506	-	1.73522e4	2776.05933	0.47	0.1322	722	-	-
1.622	-	5943.11670	1422.39819	0.31	0.0652	3427	0.69	1.08

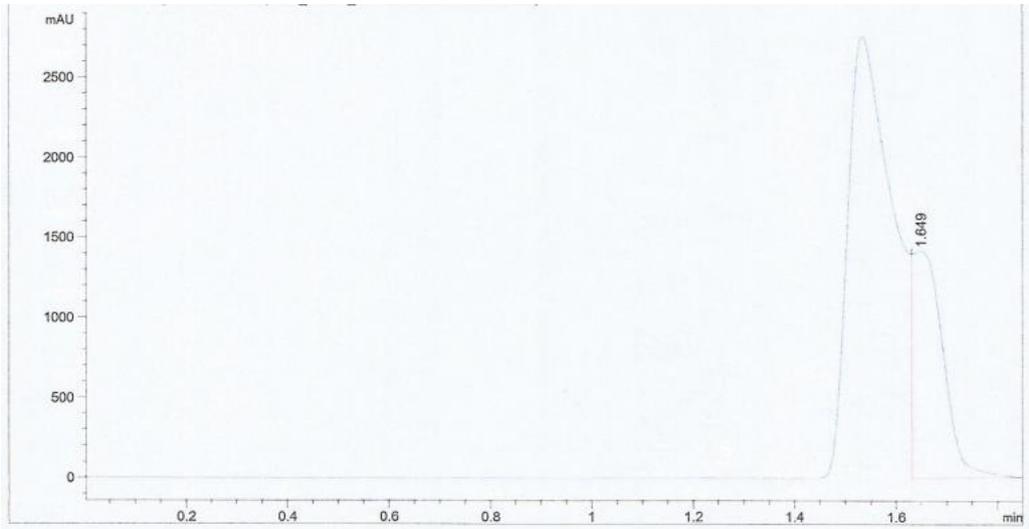


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Selectivity
1.455	-	1.73018e4	2776.79956	0.47	0.1318	675	-	-
1.570	-	5901.81494	1423.48303	0.29	0.0647	3254	0.69	1.08



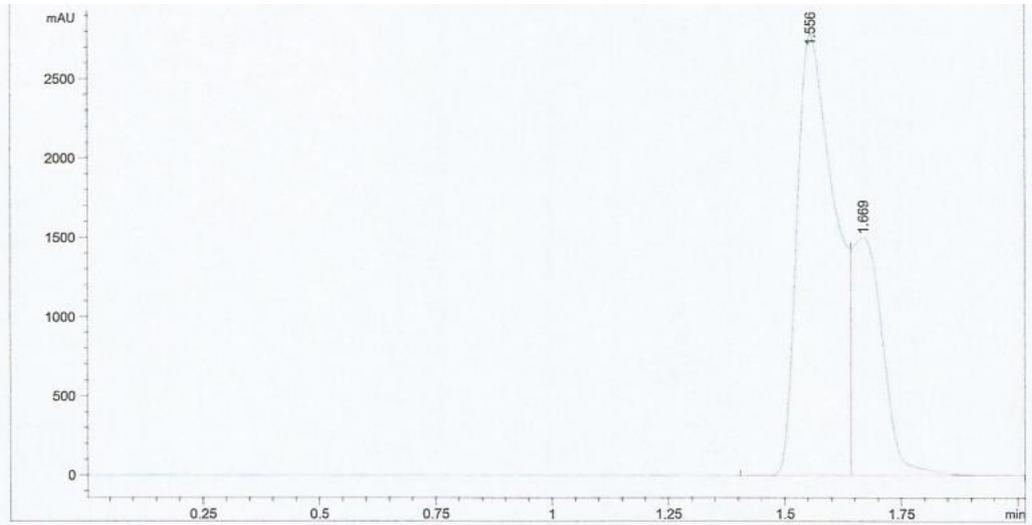
=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution	ivity
1.649	-	5833.86768	1422.20178	0.32	0.0653	3538	-	-	-

6. Presisi konsentrasi 100%

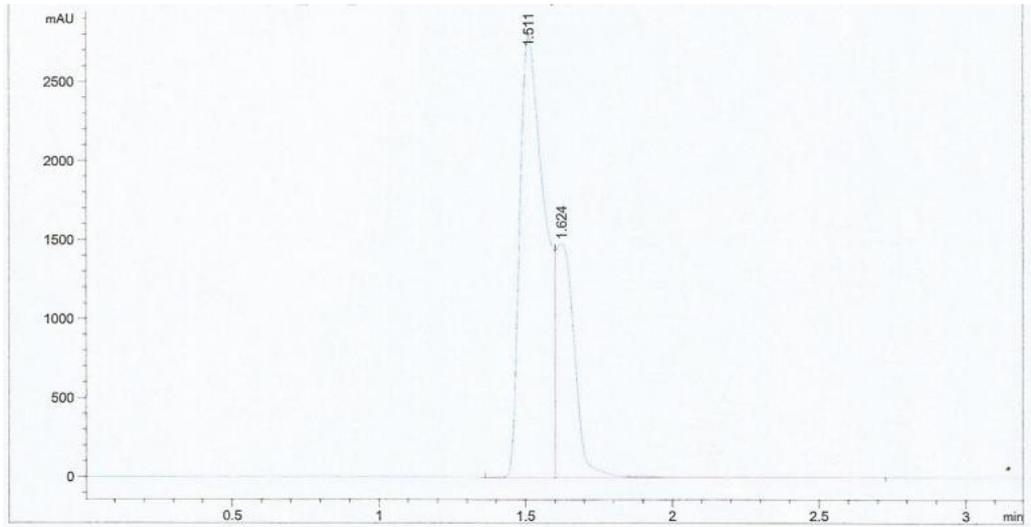


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
1.556	-	1.57704e4	2791.90552	0.52	0.1184	957	-	-
1.669	-	6826.57422	1502.86646	0.50	0.0722	2961	0.70	1.07

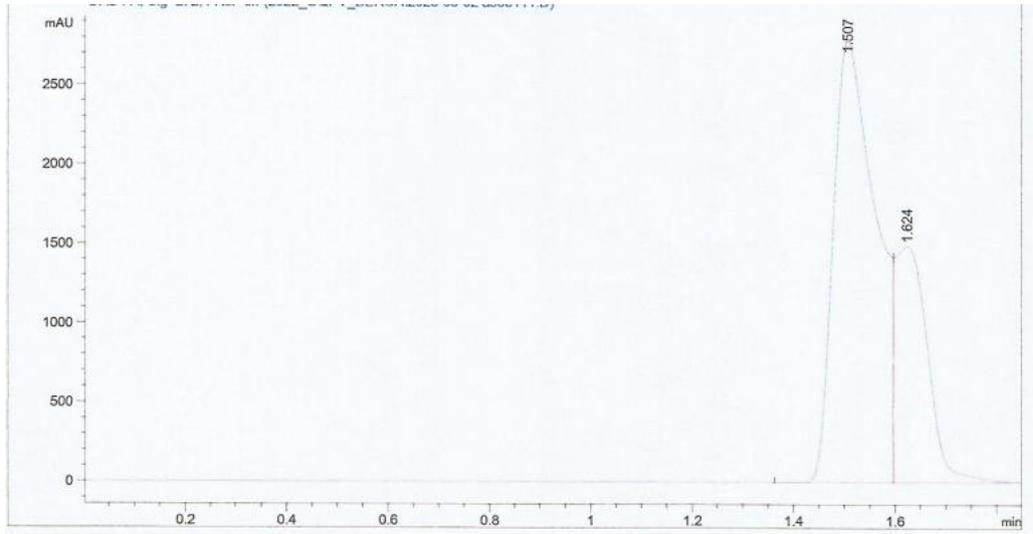


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
1.511	-	1.64116e4	2807.37915	0.50	0.1229	835	-	-
1.624	-	6570.52686	1484.51453	0.42	0.0693	3042	0.69	1.07

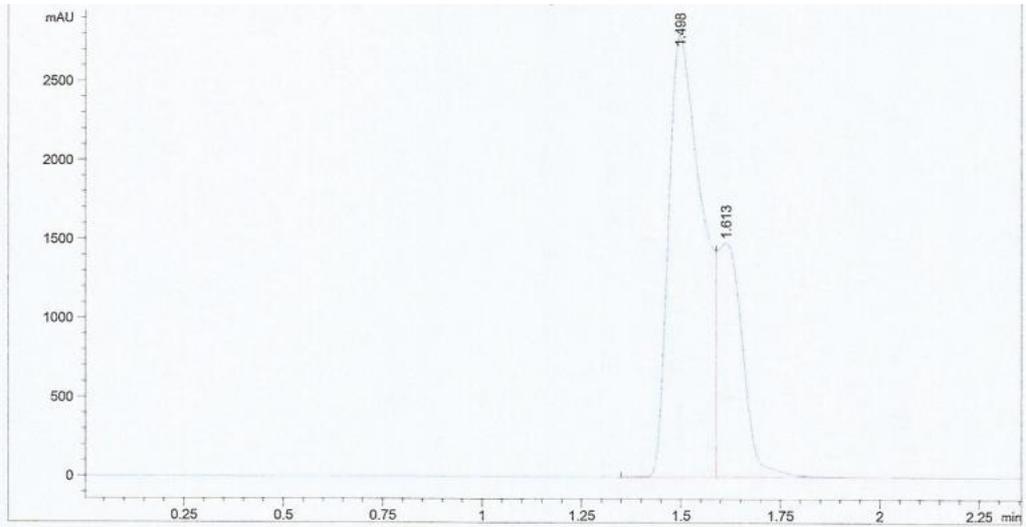


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
1.507	-	1.61732e4	2799.85791	0.50	0.1220	849	-	-
1.624	-	6652.63428	1493.01221	0.54	0.0713	2872	0.71	1.08

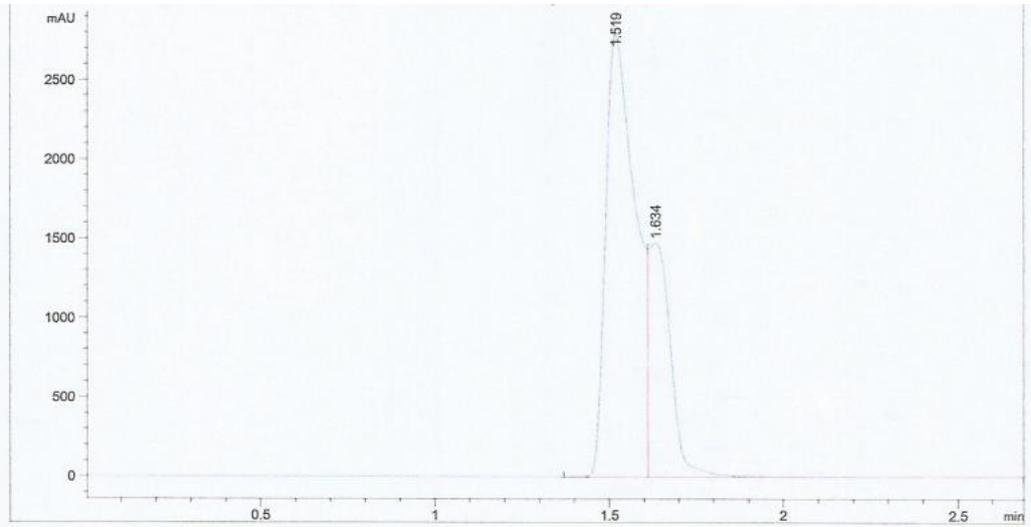


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.498	-	1.65490e4	2808.24243	0.49	0.1243	803	-	-
1.613	-	6575.73535	1485.81787	0.45	0.0697	2977	0.70	1.08

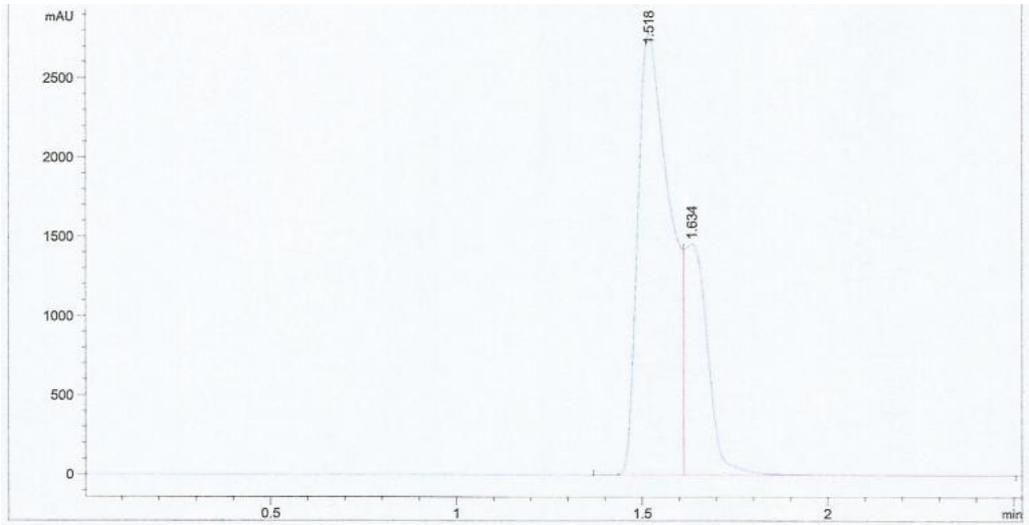


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
1.519	-	1.66139e4	2804.37134	0.49	0.1249	823	-	-
1.634	-	6463.73877	1478.92590	0.43	0.0684	3173	0.70	1.08



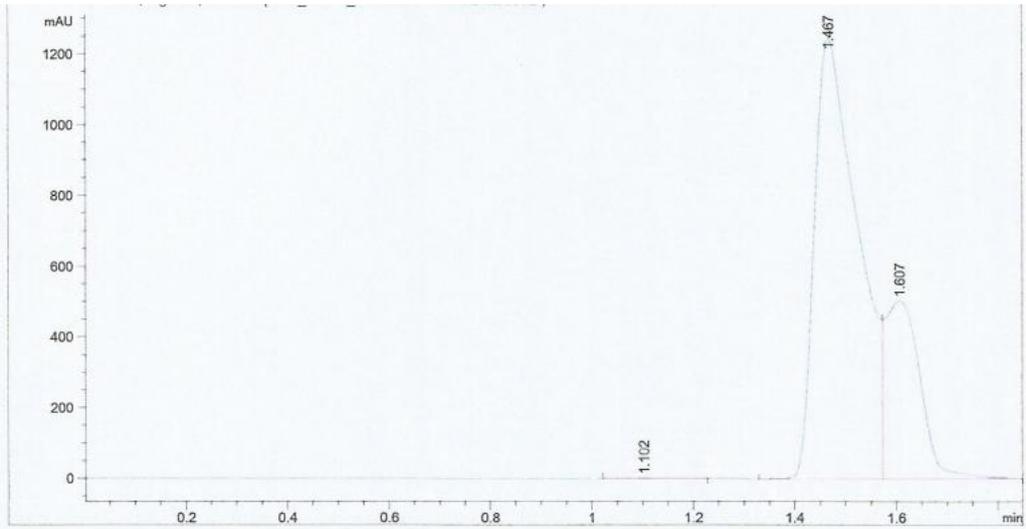
=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.518	-	1.67880e4	2801.73853	0.48	0.1267	793	-	-
1.634	-	6377.00830	1461.57312	0.41	0.0684	3174	0.70	1.08

7. Presisi konsentrasi 120%

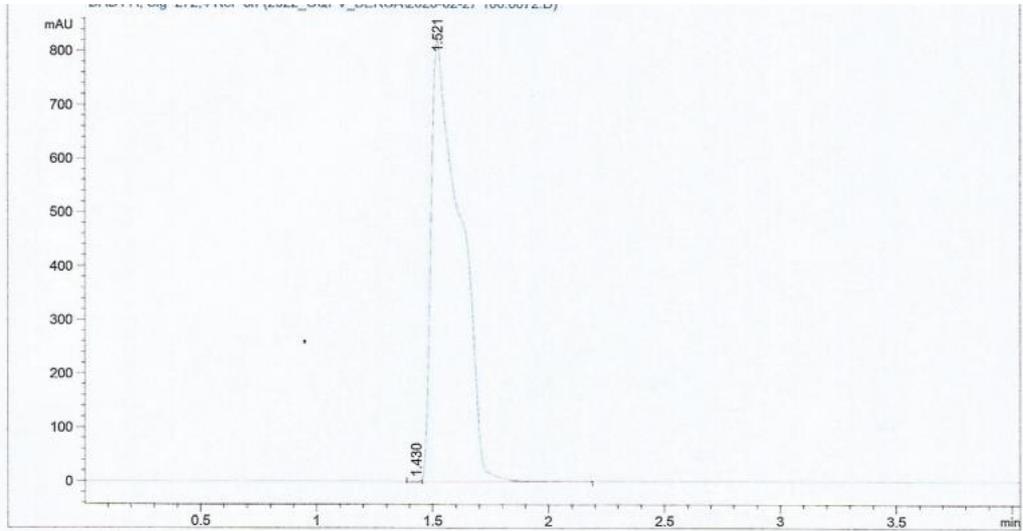


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
1.102	-	5.06927	1.04476	0.60	0.0900	831	-	-
1.467	-	7393.24365	1252.09058	0.45	0.1007	1179	2.25	1.33
1.607	-	2405.30371	504.94031	0.65	0.0776	2378	0.92	1.10

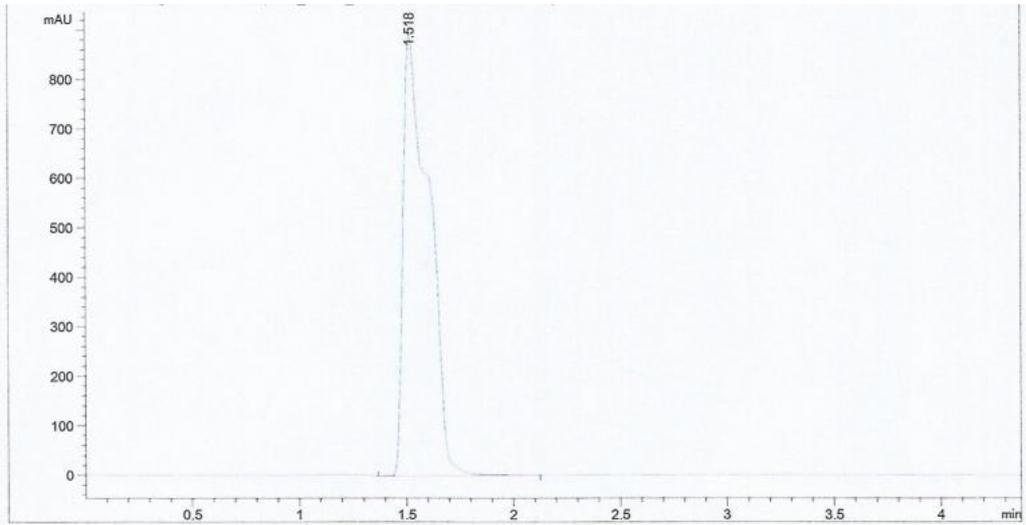


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.430	-	5.23590	2.31073	1.51	0.0474	5032	-	-
1.521	-	7129.40088	823.62634	0.26	0.1671	460	0.50	1.06

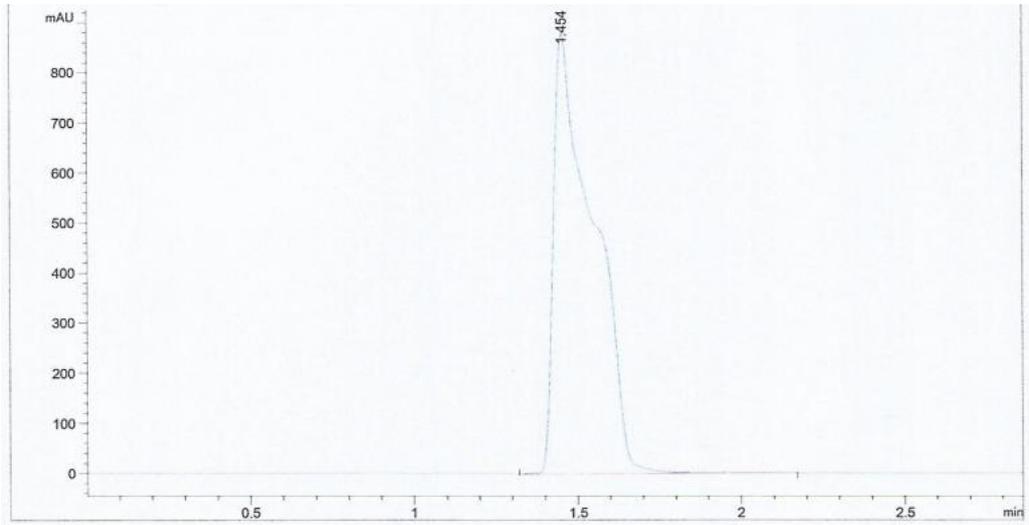


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.518	-	7516.11572	896.17688	0.31	0.1575	517	-	-

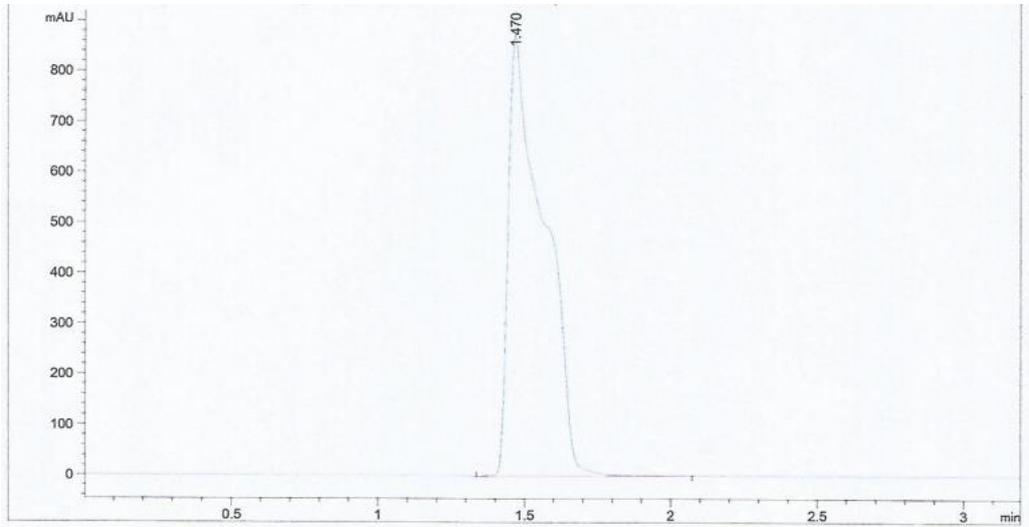


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.454	-	7433.03174	883.89581	0.24	0.1660	426	-	-

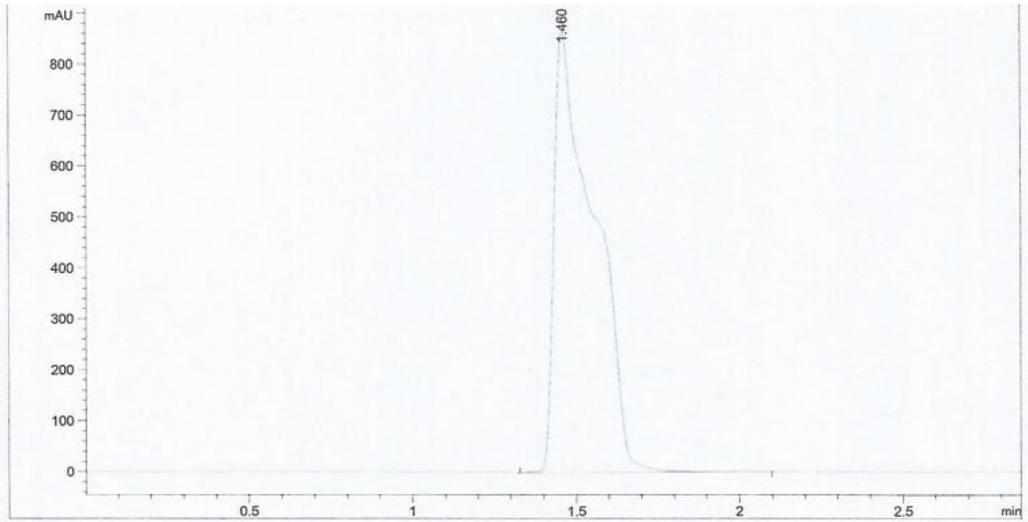


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution	ivity
1.470	-	7413.85400	877.55634	0.24	0.1685	421	-	-	-



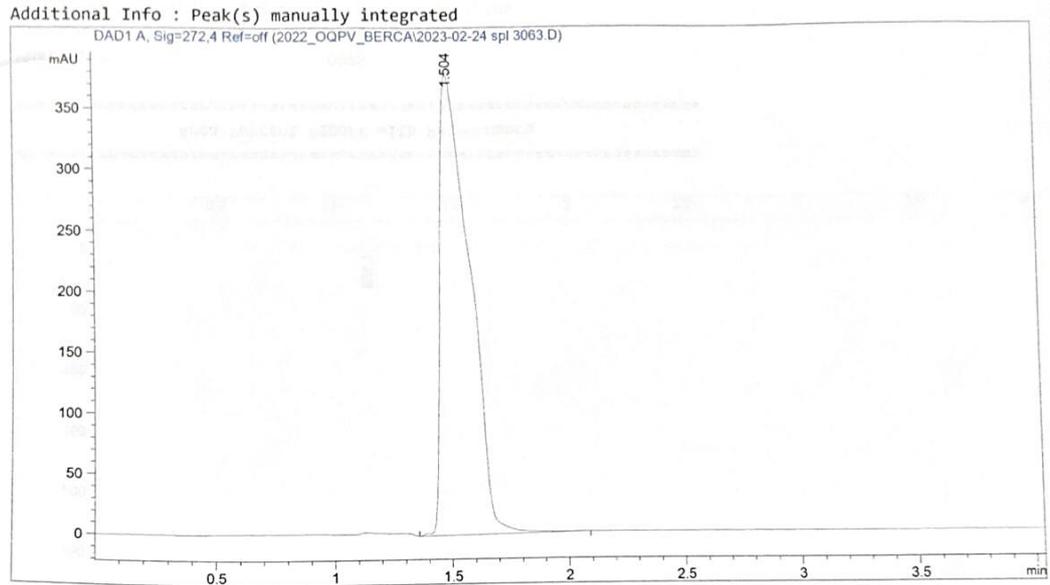
=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.460	-	7326.55469	869.82861	0.25	0.1675	422	-	-

Lampiran 15. Kromatogram dan data penetapan kadar alkaloid



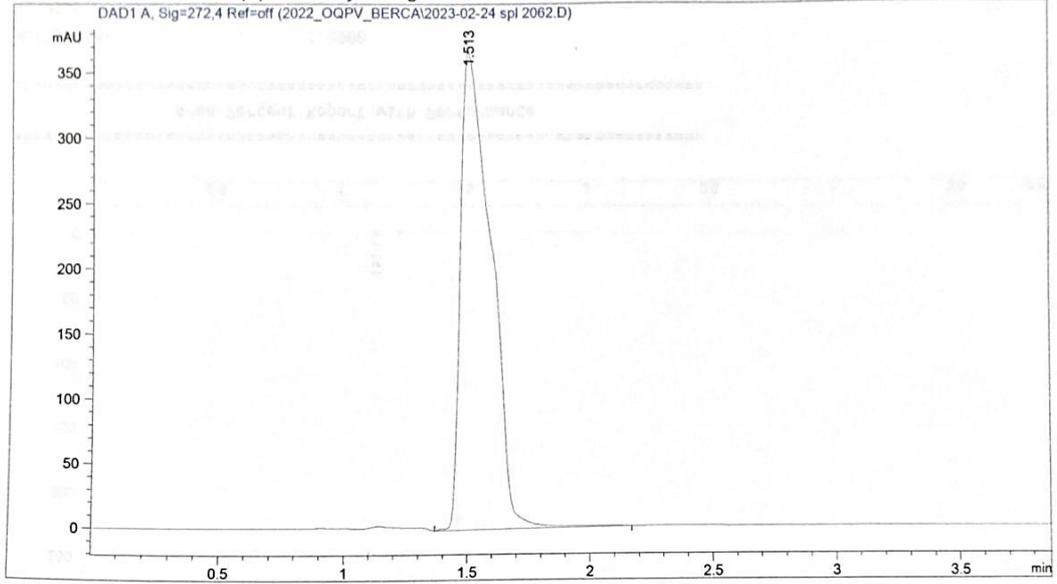
=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
1.504	-	3312.34961	379.42014	0.39	0.1545	524	-	-

Additional Info : Peak(s) manually integrated



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

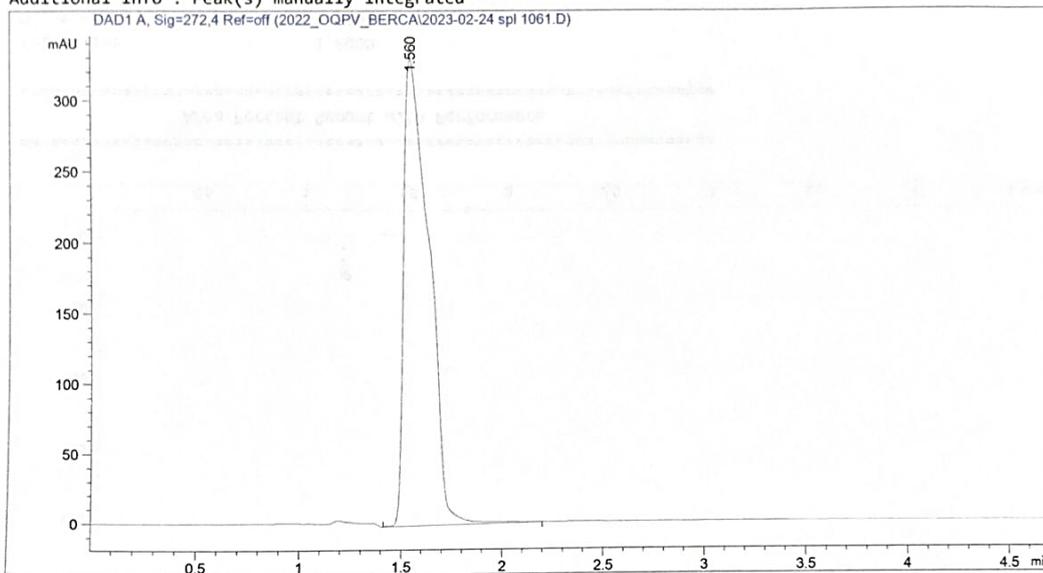
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.513	-	3160.00293	367.69571	0.38	0.1520	550	-	-

Additional Info : Peak(s) manually integrated

DAD1 A, Sig=272.4 Ref=off (2022_OQPV_BERCA\2023-02-24 spl 1061.D)



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

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

Signal 1: DAD1 A, Sig=272,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.560	-	2845.92627	331.30850	0.38	0.1519	586	-	-

Lampiran 16. Dokumentasi penelitian

