

**ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL
PADA EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ARABIKA (*Coffea
arabica*) DENGAN METODE KLT-DENSITOMETRI**

SKRIPSI



**Oleh:
Lilik Nur Fitriani
NIM. 19040072**

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

**ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL
PADA EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ARABIKA (*Coffea
arabica*) DENGAN METODE KLT-DENSITOMETRI**

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh:
Lilik Nur Fitriani
NIM. 19040072

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

HALAMAN PERSETUJUAN

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

Jember, 10 Agustus 2023

Pembimbing Utama



Mohammad Rofik Usman, M.Si
NIDN. 0705019003

Pembimbing Anggota,



Apt. Amalia Wardatul Firdaus., M.S. Farm.
NIDN. 0716059404

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Analisis Dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Pada Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) Dengan Metode KLT-Densitometri” telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada:

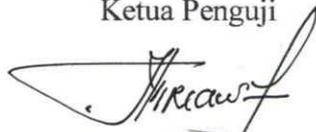
Hari : Selasa

Tanggal : 15 Agustus 2023

Tempat : Progran Studi Sarjana Farmasi Universitas dr.Soebandi

Tim Penguji

Ketua Penguji



Jamharivah, S. ST., M. Kes.
NIDN. 4011016401

Penguji II,



Mohammad Rofik Usman, M.Si
NIDN. 0705019003

Penguji III



Apt. Amalia Wardatul Firdaus., M.S.Farm.
NIDN. 0716059404

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan

Universitas dr. Soebandi



Apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm
NIDN. 0703068903

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Lilik Nur Fitriani

Nim 19040072

Program Studi : Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember

Menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul “Analisis Dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Pada Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) Dengan Metode KLT-Densitometri” adalah karya saya sendiri dan belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaaan suatu perguruan tinggi manapun. Selain itu, sumber informasi yang dikutip penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari ditemukan adanya kecurangan dalam penyusunan skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Jember, 10 Agustus 2023

Yang Menyatakan



(Lilik Nur Fitriani)

SKRIPSI

ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL PADA EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ARABIKA (*Coffea arabica*) DENGAN METODE KLT-DENSITOMETRI

Oleh:

Lilik Nur Fitriani

NIM. 19040072

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Mohammad Rofik Usman, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : apt. Amalia Wardatul Firdaus., M.S. Farm.

LEMBAR PERSEMBAHAN

Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayahnya yang selalu memberikan petunjuk, kelancaran, kemudahan, dan keyakinan sehingga saya dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini tepat pada waktunya. Maka pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

- 1) Kepada kedua orang tua yang selalu memberi dukungan dan perhatian kepada penulis dan memberikan semangat serta doa terbaik untuk kelancaran pendidikan putrinya.
- 2) Kepada segenap Ibu dan Bapak Dosen Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember yang telah memberikan banyak sekali ilmu serta pengalaman selama masa perkuliahan.
- 3) Kepada Nadha dan Dana terima kasih sudah menemani penulis dalam menyelesaikan penelitian.
- 4) Kepada teman-teman kelas 19B Farmasi terima kasih yang telah kebersamai saya dalam menempuh pendidikan sarjana farmasi dari awal saya menempuh pendidikan ini hingga saya dapat menyusun skripsi ini selesai.
- 5) *Last but not least* diri saya sendiri yang telah mampu dan sudah berjuang untuk menyelesaikan pendidikan sampai akhir dan merampungkan skripsi.

MOTTO

“Musuh yang paling berbahaya di atas dunia ini adalah penakut dan bimbang.
teman yang paling setia, hanyalah keberanian dan keyakinan yang Teguh.”

(Andrew Jackson)

“Pendidikan memiliki akar yang pahit, akan tetapi memiliki buah yang manis”

(Aristoteles)

“Tidak ada ujian yang tidak bisa diselesaikan. Tidak ada kesulitan yang melebihi
kesanggupan. Karena Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan
kadar kesanggupannya”

(QS. Albaqarah: 286)

“Boleh jadi kamu membenci sesuatu padahal ia amat baik bagimu dan boleh jadi
pula kamu menyukai sesuatu padahal ia amat buruk bagimu. Allah mengetahui
sedang kamu tidak mengetahui.”

(Qs. Albaqarah:216)

ABSTRAK

Nur Fitriani, Lilik* Rofik Usman, Mohammad** Wardatul Firdaus, Amalia***. 2023. **Analisis Dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Pada Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) Dengan Metode Klt-Densitometri.** Skripsi.Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr.Soebandi.

Latar Belakang: Kopi arabika (*Coffea arabica*) merupakan salah satu tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder salah satunya adalah alkaloid. Kopi arabika (*Coffea arabica*) banyak memberi manfaat bagi kesehatan dan pengobatan tradisional karena banyak mengandung senyawa metabolit sekunder dengan berbagai bioaktivitas antibakteri, antihipertensi, antioksidan, antivirus, dan antidiabetes. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis dan penetapan kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kopi arabika dengan metode KLT-Densitometri.

Metode: Desain penelitian ini berupa dekskriptif laboratorium secara kualitatif dengan metode studi eksperimental. Hasil nilai R_f dan secara kuantitatif dengan hasil % kadar alkaloid total. Pada penelitian ini dilakukan optimasi fase gerak, optimasi Panjang gelombang, optimasi konsentrasi larutan, dan penetapan kadar dengan metode KLT-Densitometri.

Hasil: Ekstrak etanol biji kopi arabika (*Coffea arabica*) didapatkan ekstrak kental sebesar 10,84% dan dinyatakan positif mengandung alkaloid dengan menggunakan pereaksi mayer, dragendroff, dan bauchardat. Optimasi fase gerak terbaik menggunakan etil asetat:metanol (8:2) v/v. Menggunakan 5 seri standart dengan konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm didapatkan nilai regresi $Y =$

$0,000003 + 0,0178 r^2 = 0,9952$ dan 3 replikasi konsentrasi sampel 5000 ppm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh 275 nm dan nilai korelasi = 0,9993. Kadar alkaloid total ekstrak etanol biji kopi arabika (*Coffea arabica*) sebesar 8,56%.

Kesimpulan: Ekstrak randemen yang diperoleh sudah memenuhi syarat >10%. Pada analisis dan penetapan kadar ini didapatkan fase gerak terbaik, panjang gelombang maksimum, optimasi kurva baku, dan penentuan konsentrasi. Analisis dan penetapan kadar alkaloid total pada ekstrak etanol didapatkan 8,56%.

Kata Kunci: Kopi Arabika (*Coffea arabica*), Alkaloid, KLT-Densitometri

*Peneliti

** Pembimbing 1

***Pembimbing 2

ABSTRACT

Nur Fitriani, Lilik* Rofik Usman, Mohammad** Wardatul Firdaus, Amalia***. 2023. *Analysis and Determination of Total Alkaloid Content in Arabica Coffee Bean Ethanol Extract (Coffea arabica) Using Tlc-Densitometry Method*. Thesis. University of Pharmacy Undergraduate Study Program dr. Soebandi.

Background: Arabica coffee (*Coffea arabica*) is a plant that contains secondary metabolites, one of which is alkaloid. Arabica coffee (*Coffea arabica*) provides many benefits for health and traditional medicine because it contains many secondary metabolites with various antibacterial, antihypertensive, antioxidant, and antidiabetic bioactivities. The purpose of this study was to analyze and determine the total alkaloid content in the ethanol extract of Arabica coffee beans using the TLC-Densitometry method.

Methods: The research design is in the form of a qualitative descriptive laboratory with an experimental study method. The results of the Rf value and quantitatively with the results of % total alkaloid content in this research optimization of the mobile phase, optimization of wavelength, optimization of solution concentration, and assay were carried out using the TLC-Densitometry method.

Results: The ethanol extract of arabica coffee beans (*Coffea arabica*) obtained a thick extract of 10.84% and tested positive for alkaloids using mayer, dragendroff, and bauchardat reagents. The best mobile phase optimization uses ethyl acetate:methanol (8:2) v/v. Using 5 standard series with concentrations of 200, 400, 600, 800, and 1000 ppm, the regression value $Y = 0.000003 + 0.0178$ $r^2 = 0.9952$ and 3 replicates of the sample concentration of 5000 ppm were obtained. The maximum wavelength obtained is 275 nm and the correlation value = 0.9993. The total alkaloid content of the ethanol extract of arabica coffee beans (*Coffea arabica*) was 8.56%.

Conclusion: The random extract obtained met the requirements of > 10%. In this analysis and assay, the best mobile phase, maximum wavelength, standard curve optimization, and concentration determination were obtained. Analysis and determination of total alkaloid content in the ethanol extract obtained 8.56%.

Keywords: Arabica Coffee (*Coffea arabica*), Alkaloids, TLC-Densitometry

*Author

**Advisor 1

***Advisor 2

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah hirobbil alamin segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta karunianya kepada kita semua, sehingga penyusunan Skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan untuk menyelesaikan Pendidikan Program Studi Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember dengan judul “Analisis Dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Pada Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika *Coffea arabica* Dengan Metode KLT-Densitometri”. Selama proses penyusunan Skripsi ini penulis dibimbing dan dibantu oleh banyak pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Ibu apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm Selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi Jember.
2. Ibu apt. Dhina Ayu Susanti., M. Kes. Selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember
3. Ibu Jamhariyah, S. ST., M. Kes. Selaku ketua penguji
4. Bapak Mohammad Rofik Usman, M. Si. Selaku dosen pembimbing utama
5. Ibu apt. Amalia Wardatul Firdaus., M.S. Farm. Selaku pembimbing anggota

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

Jember, 10 Agustus 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	v
SKRIPSI.....	vi
LEMBAR PERSEMBAHAN	vii
MOTTO.....	viii
ABSTRAK.....	ix
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Bagi Peneliti.....	5
1.4.2 Bagi Institusi Pendidik	5
1.4.3 Bagi Peneliti Selanjutnya	5
1.4.4 Bagi Masyarakat	6
1.5 Keaslian Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Tanaman Kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>).....	7
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>).....	7
2.1.2 Morfologi Tanaman Kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>).....	8
2.1.3 Kandungan dan Manfaat Biji Kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>)	9
2.2 Ekstraksi.....	9
2.2.1 Definisi Ekstraksi.....	9
2.2.2 Tujuan Ekstraksi	10
2.2.3 Jenis-jenis Ekstraksi.....	11
2.3 Tinjauan Maserasi	13
2.3.1 Pengertian Maserasi	13
2.3.2 Prinsip Kerja Maserasi	14
2.4 Tinjauan Pelarut pada Ekstraksi.....	15

2.5 Etanol.....	17
2.6 Kloroform	18
2.7 Skrining Fitokimia.....	19
2.8 Alkaloid	20
2.9 Kafein	22
2.10 Kromatografi Lapis Tipis.....	24
2.10.1 Definisi Kromatografi Lapis Tipis	24
2.10.2 Tujuan Penggunaan Kromatografi Lapis Tipis	28
2.10.3 Sistem Kromatografi Lapis Tipis	29
2.11 Densitometri.....	30
BAB 3 KERANGKA KONSEP.....	33
3.1 Kerangka Konsep	33
3.2 Hipotesis.....	34
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	35
4.1 Desain Penelitian.....	35
4.2 Populasi	35
4.3 Sampel.....	35
4.4 Variabel Penelitian.....	35
4.4.1 Variabel Bebas	35
4.4.2 Variabel Terikat	36
4.5 Tempat Penelitian	36
4.6 Waktu Penelitian.....	36
4.7 Definisi Operasional	36
4.8 Teknik Pengumpulan Data.....	39
4.8.1 Determinasi Tanaman	39
4.8.2 Pengambilan Sampel	39
4.8.3 Ekstraksi Sampel	40
4.8.4 Uji Alkaloid	40
4.8.5 Penetapan Kadar Alkaloid Menggunakan KLT-Densitometri.....	41
BAB 5 HASIL PENELITIAN	46
5.1 Ekstraksi Maserasi.....	45
5.2 Uji Alkaloid.....	45
5.3 Optimasi Kondisi Analisis Kadar Alkaloid Total	46
5.4 Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>).....	49
BAB 6 PEMBAHASAN	52
6.1 Ekstraksi Biji Kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>)	51
6.2 Uji Alkaloid.....	52
6.3 Penetapan Kadar Alkaloid Total	53
6.3.1 Optimasi Fase Gerak	53
6.3.2 Optimasi Panjang Gelombang	55
6.3.3 Penentuan Konsentrasi	56
6.3.4 Penetapan Kadar Alkaloid Total	57

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	62
7.1 Kesimpulan	62
7.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN.....	69

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Keaslian penelitian	6
Tabel 4.1 Definisi Operasional	36
Tabel 4.2 Larutan Pereaksi Atau Reagen.....	41
Tabel 4. 3 Preparasi Larutan Standart Kafein.....	43
Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Randemen Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika.....	46
Tabel 5.2 Hasil Uji Alkaloid Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika	46
Tabel 5.3 Data Nilai Luas Area dan Nilai Rf	50
Tabel 5.4 Hasil Perhitungan Kadar Alkaloid Total	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Kopi Arabika	7
Gambar 2.2 Prinsip like dissolves like	15
Gambar 2.3 Etanol	18
Gambar 2.4 Struktur Serotin	22
Gambar 2.5 Struktur Meskalin dan Efedrina	22
Gambar 2.6 Struktur Konessin dan Kafein	22
Gambar 2.7 Struktur Kafein.....	23
Gambar 2.8 Skema Sistem Optik Densitometri.....	28
Gambar 3.1 Kerangka konsep	33
Gambar 5. 1 Fase gerak kloroform : etanol (96 : 4) v/v	47
Gambar 5.2 Fase gerak kloroform:metanol (9:1) v/v.....	48
Gambar 5.3 Fase gerak etil asetat : metanol (8:2) v/v.....	48
Gambar 5.4 Panjang gelombang maksimum (275 nm).....	49
Gambar 5.5 Kurva Baku Kafein	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal Kegiatan Skripsi.....	69
Lampiran 2. Determinasi Tanaman	70
Lampiran 3. Dokumentasi Sertifikat Kafein	71
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian.....	72
Lampiran 5. Tabel Perhitungan Ekstraksi Maserasi.....	76
Lampiran 6. Tabel Nilai Luas Area dan Nilai Rf.....	77
Lampiran 7. Perhitungan Konsentrasi Kurva Baku.....	78
Lampiran 8. Perhitungan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Biji Kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>).....	79
Lampiran 9. Output Instrument Densitometri.....	83

DAFTAR SINGKATAN

a	: Konstanta
b	: Koefisien partisi
C	: Konsentrasi
CAMAG	: Skema sistem optic
DensitometriCm	: Sentimeter
°C	: Derajat Celsius
E	: Extinction Coefficient
FP	: Faktor Pengenceran
g	: Gram
IR	: Inframerah
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
mg	: Miligram
mL	: Mililiter
N	: Normalitas
Nm	: Nanometer
NMR	: <i>Nuclear magnetic resonance</i>
PPM	: <i>Parts per million</i>
R	: Reflektan
REM	: Radiasi elektromagnetik
Rf	: <i>Retardation factor</i>
RSD	: Relatif Standart Deviasi
S	: <i>Scattering Coeficient</i>
SD	: Standart Deviasi
Uv	: Ultraviolet
Vis	: Visible
X	: Konsentrasi analit
Y	: Absorbansi
μL	: Mikroliter

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara agraris yang dikenal memiliki kekayaan alam yang melimpah salah satunya tumbuhan. Tumbuhan ini digunakan untuk pengobatan tradisional diwariskan secara turun-temurun oleh nenek moyang kita karena didalam tanaman tersebut mengandung zat aktif atau metabolit sekunder yang berfungsi untuk pengobatan. Saat ini masyarakat banyak memilih untuk *back to nature* atau kembali menggunakan obat herbal karena bahan yang mudah didapat, dan harga yang terjangkau bagi masyarakat (Budiman dkk., 2014). Salah satu tanaman yang berpotensi digunakan untuk pengobatan yaitu kopi yang pada umumnya kopi dimanfaatkan sebagai produk minuman yang berasal dari olahan biji tanaman kopi. Kopi mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder misalnya alkaloid. Pada penelitian sebelumnya dinyatakan bahwa alkaloid memiliki aktivitas biogis sebagai antioksidan, antibakteri, dan antiradang (Latief dkk., 2021).

Salah satu tanaman yang mengandung alkaloid yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*). Kopi termasuk tanaman perkebunan yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi di Indonesia kopi yang dikembangkan yaitu kopi robusta dan kopi arabika sesuai dengan iklim daerah pengembangnya (Edowai, 2019). Untuk mendapatkan senyawa alkaloid dapat dilakukan dengan beberapa metode ekstraksi, pada penelitian ini menggunakan ekstraksi maserasi. Dipilihnya metode maserasi ini bertujuan untuk melakukan pemisahan tanpa pemanasan agar dapat mencegah

rusaknya kandungan senyawa yang terdapat pada kopi arabika (Furqan dan Nurman, 2020). Maserasi pada sampel bubuk biji kopi arabika ini menggunakan pelarut etanol, pemilihan pelarut ini karena dapat mengekstrak semua senyawa metabolit sekunder (Kapondo dkk., 2020). Menurut Trifani (2012), etanol memiliki sifat polar dan mudah didapat. Konsentrasi pelarut yang dipilih adalah etanol 96% dibandingkan dengan konsentrasi lainnya 50% dan 70%, etanol dengan konsentrasi 96% dapat menghasilkan kadar alkaloid total tertinggi (Wahyuni dan Marpaung, 2020).

Identifikasi kandungan senyawa yang dilakukan pada kopi arabika yaitu dengan skrining fitokimia. Identifikasi skrining fitokimia dilakukan untuk menganalisa kandungan bioaktif yang digunakan untuk pengobatan. Skrining fitokimia ini merupakan analisis kualitatif untuk mengetahui senyawa kimia yang terdapat pada bagian tumbuhan terutama kandungan metabolit sekunder seperti, flavonoid, alkaloid, saponin, polifenol, antrakuinon, kumarin (Marjoni, 2016). Penelitian Ajhar dkk (2020) menunjukkan bahwa biji kopi arabika mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, dan tanin. Pada penelitian kali ini identifikasi kandungan senyawa alkaloid pada ekstrak etanol kopi arabika dengan menggunakan pereaksi mayer, bouchardat, dan dragendorff (Ajhar dkk., 2020). Pada penelitian ini juga diperlukan pembanding sebagai kontrol positif.

Pembanding yang digunakan untuk analisis kadar alkaloid total ekstrak etanol kopi arabika yaitu kafein. Penggunaan kafein sebagai pembanding karena termasuk golongan senyawa "metilxantine". Metilxantin merupakan senyawa alami derivat xantin yang merupakan golongan senyawa alkaloid (Fajriana dkk.,

2018).

Pada penelitian Salamah (2017) penetapan kadar alkaloid total daun jembirit (*Tabernaemontana sphaerocarpa*. BL), menunjukkan bahwa daun jembirit mengandung alkaloid, dengan metode maserasi adalah $0,727\% \pm 0,0032$ dan dengan metode soxhletasi $0,666\% \pm 0,0022$. Selain itu pada penelitian penetapan kadar alkaloid total akar kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers) dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol dengan konsentrasi 50%, 70%, dan 96%. Hasil penetapan kadar alkaloid total menggunakan pelarut etanol 50% sebesar $0,6939 \pm 0,2439\%$, pelarut etanol 70% sebesar $0,6607 \pm 0,2117\%$, dan pelarut etanol 96% sebesar $0,7826 \pm 0,3004\%$ (Wahyuni dan Marpaung, 2020).

Untuk penetapan kadar alkaloid dapat menggunakan beberapa metode yaitu Spektrofotometer Uv-Vis, SPE-MIP *Molecular Imprinted Polymer Solid Phase Extraction*, HPLC *High Performance Liquid Chromatography*, UPLC *Ultra Performance Liquid Chromatography*, dan KLT-Densitometri (Fatan dkk., 2022). Pada penelitian ini menggunakan metode KLT-Densitometri, yaitu metode kromatografi lapis tipis dengan kombinasi densitometri (KLT-Densitometri). KLT-Densitometri memiliki kelebihan yaitu dapat melakukan penetapan kadar antara sampel dan kontrol positif secara bersamaan, dapat melakukan pemisahan senyawa yang dituju dari komponen lain dan waktu yang diperlukan relatif singkat, metode KLT pelaksanaannya lebih murah dan mudah dan peralatan yang diperlukan cukup sederhana jika dibandingkan dengan metode yang lain. (Fatimah dkk., 2020). Untuk densitometri merupakan instrument yang memiliki kelebihan

seperti, spesifitas yang tinggi, dapat dikerjakan dengan mudah dan cepat, biaya untuk pengoperasian cukup murah karena pelarut yang dibutuhkan relative sedikit dan silika gel sebagai fase diamnya dapat didaur ulang, dan untuk pemilihan fase gerak dapat memberikan fleksibilitas yang besar (Savitri dkk., 2019).

Berdasarkan dengan latar belakang diatas, peneliti akan melakukan analisis penetapan kadar alkaloid pada ekstrak etanol kopi arabika. Kandungan senyawa alkaloid pada kopi arabika berpotensi sebagai alternatif. Maka dari itu, penelitian yang berjudul “Analisis Dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Pada Ekstrak Etanol Kopi Arabika (*Coffea arabica*) Dengan Metode KLT-Densitometri” layak untuk dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Berapa kadar alkaloid ekstrak etanol 96% kopi arabika (*Coffea arabica*) menggunakan KLT- Densitometri?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk menganalisis kadar alkaloid pada ekstrak etanol kopi arabika (*Coffea arabica*) dengan menggunakan metode KLT-Densitometri.

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1) Untuk memperoleh ekstrak etanol dan persen randemen kopi arabika(*Coffea arabica*) dengan metode maserasi
- 2) Untuk mengetahui kandungan alkaloid yang terdapat pada ekstrak etanol biji kopi arabika
- 3) Untuk menganalisis keberadaan senyawa alkaloid pada ekstrak

etanol dan kadar alkaloid total kopi arabika (*Coffea arabica*)
menggunakan metode KLT-Densitometri

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1.4.1 Bagi Peneliti

Menginformasikan tentang analisis dan penentuan jumlah total alkaloid pada ekstrak biji kopi arabika (*Coffea arabica*) menggunakan pelarut etanol dengan metode KLT- Densitometri.

1.4.2 Bagi Institusi Pendidik

Dalam studi ini diharapkan bahwa hasilnya dapat menjadi tambahan informasi berharga bagi institusi, sehingga pengembangan penelitian selanjutnya dapat tercapai dan beragam.

1.4.3 Bagi Peneliti Selanjutnya

Dapat menjadi dasar diharapkan dapat digunakan sebagai sumber atau bahan bagi peneliti selanjutnya agar dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang analisis dan penetapan kadar alkaloid total pada sampel tanaman kopi arabika pada bagian lain dengan metode KLT-Densitometri.

1.4.4 Bagi Masyarakat

Memberikan informasi kadar alkaloid total yang terkandung dalam biji kopi arabika (*Coffea arabica*)

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian penelitian

Penelitian	Persamaan	Perbedaan
Wahyuni dan Marpaung, (2020)	Metode ekstraksi maserasi	<ol style="list-style-type: none"> 1) Menggunakan metode spektrofotometri Uv-vis 2) Menggunakan tanaman akar kuning 3) Menggunakan pelarut etanol 50%, 70%, dan 96%
Budiman dkk., (2014)	Kromatografi Lapis Tipis	<ol style="list-style-type: none"> 1) Menggunakan pelarut aquadest 2) Menggunakan kopi robusta 3) Menggunakan ekstraksi refluks
Salamah, (2017)	Metode ekstraksi maserasi	<ol style="list-style-type: none"> 1) Menggunakan metode spektrofotometri Uv-vis 2) Menggunakan daun jembirit 3) Menggunakan pelarut etanol 70%

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Arabika (*Coffea arabica*)



Gambar 2.1 Tanaman Kopi Arabika (Asiah., 2022)

Kopi arabika (*Coffea arabica*) tumbuh optimal pada ketinggian 1000-1200 m dpl dengan temperatur 17° – 21° C. Semakin tinggi tempat penanaman cita rasa biji kopi arabika yang dihasilkan semakin baik, oleh karena itu perkebunan kopi arabika berada didaerah tertentu (Anshori, 2014). Kopi arabika tanaman yang bertajuk kecil percabangannya lentur dan berdaun tipis.

Klasifikasi Tanaman Kopi Arabika:

Kingdom : *Plantae* (Tumbuhan)

Subkindom : *Tracheobionta* (Tumbuhan berpembuluh)

Divisi : *Magnoliophyta* (Tumbuhan berbunga)

Kelas : *Magnoliopsida* (Tumbuhan berkeping dua/dikotil)

Sub kelas : *Asteridae*

Ordo : *Rubiales*

Famili : *Rubiaceae* (suku kopi-kopian)

Genus : *Coffea*

Spesies : *Coffea arabica L.*

2.1.2 Morfologi Tanaman Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

Kopi arabika tumbuh dalam bentuk pohon kecil dengan ketinggian sekitar 5 m hingga 6 m, dan ketika mencapai tinggi sejajar dengan dada orang dewasa, memiliki diameter batang sekitar 7 cm. Ada dua jenis percabangan pada kopi arabika, yaitu orthogeotropic yang mampu tumbuh secara vertikal, dan plagiogeotropic yang memiliki cabang yang berbeda dari batang utama. Kulit biji kopi arabika berwarna abu-abu, tipis, memiliki tekstur kasar, dan cenderung pecah-pecah saat matang (Hailu, 2011). Tanaman kopi arabika menyukai tanah yang kaya akan unsur organik agar dapat menjaga kelembapan pH tanah yang dianjurkan untuk kopi arabika sekitar 5,5-6. Menurut Wachjar (1984) Kopi termasuk dalam kategori tanaman pendek hari (*short day plant*) karena fase pembungaan pada tanaman ini terjadi ketika durasi siang hari kurang dari 12 jam.

Buah kopi biasanya akan mencapai kematangan dalam rentang waktu 7-11 bulan, yang terdiri dari buah dan biji. Buah kopi terdiri dari tiga bagian: eksokarp (kulit luar), mesokarp (daging buah), dan endokarp (kulit pergamen atau kulit tanduk tipis yang keras). Isi dari buah kopi biasanya terdapat dua butir biji kopi, terkadang juga dapat hanya terdapat satu butir biji. Tumbuhan kopi arabika berakar tunggang memiliki panjang berkisar 45-50 cm, dan untuk perakaran

kopi arabika lebih dalam jika dibandingkan dengan kopi robusta maka dari itu kopi arabika lebih tahan kering keberadaan perakaran kopi berada dilapisan tanah diatas 30 cm (Muharam dan Sriwidodo, 2022).

2.1.3 Kandungan dan Manfaat Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

Kopi arabika (*Coffea arabica*) banyak memberi manfaat bagi kesehatan dan pengobatan tradisional karena banyak mengandung senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, saponin serta golongan steroid dan terpenoid dengan berbagai bioaktivitas antibakteri, antihipertensi, antioksidan, antivirus, dan antidiabetes (Ajhar dkk., 2020). Biji kopi arabika mengandung senyawa bioaktif seperti asam klorogenat, tanin, trigonelin, kafein dan lainnya yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Al-Yousef dan Amina, 2018). Pada penelitian Kosasih dkk. (2021) dapat dibuktikan potensi biji kopi arabika sebagai antibakteri, dilakukan uji antibakteri pada bakteri *Escheria coli*.

Biji kopi arabika secara fitokimia menunjukkan adanya karbohidrat, asam amino, serat, asam organik, kafein, lipid, mineral, dan trigonelin, sedangkan pada fraksi volatil ditemukan senyawa volatil seperti keton, hidrokarbon, alkohol, ester,aldehida, furan, dan pirazina (Al-Yousef dan Amina, 2018). Berdasarkan penelitian sebelumnya biji kopi arabika memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antihipertensi, analgesik, antiradang, antimutagenik, antidiabetes, antivirus, antijamur, antipiretik, dan antitumor (Hamdani dan Nurman, 2020).

2.2 Ekstraksi

2.2.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pengasingan zat aktif dari komponen tumbuhan dengan tujuan mengekstrak komponen kimia yang terdapat dalam bagian-bagian tumbuhan. Proses ekstraksi melibatkan perpindahan massa dari komponen zat padat dalam simplisia ke dalam pelarut organik yang digunakan. Zat terlarut alami akan memasuki lapisan sel tumbuhan yang mengandung zat dinamis, yang kemudian, pada saat itu, terurai menjadi zat terlarut alami di luar sel dan secara bertahap berdifusi ke dalam zat terlarut. Siklus ini akan berulang hingga pengelompokan zat dinamis di dalam dan di luar sel mencapai keseimbangan (Marjoni, 2022).

Ekstraksi dapat diterapkan melalui berbagai cara dan metode yang disesuaikan dengan kualitas dan tujuan ekstraksi. Sampel ekstraksi bisa berupa sampel segar maupun kering. Pilihan untuk menggunakan sampel segar memiliki keunggulan karena menghindari potensi pengembangan resin polimer yang mungkin terjadi selama sistem pengeringan. Selain itu, penggunaan sampel kering juga memiliki keuntungan dalam mengurangi kandungan air dalam sampel, sehingga mencegah kerusakan akibat aktivitas antimikroba. Istilah umum yang terkait dengan siklus ekstraksi antara lain menstruum (zat yang dapat larut atau kombinasi pelarut) dan rafinat (tinggal dari siklus ekstraksi), rarities kuno (zat lain diperoleh selain zat yang terkandung dalam sampel) (Marjoni, 2022).

2.2.2 Tujuan Ekstraksi

Ekstraksi bertujuan untuk memisahkan atau menarik semua zat aktif dan kandungan senyawa lain pada simplisia. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat senyawa, dan pelarut yang digunakan. Alkohol seringkali menjadi pilihan utama sebagai pelarut dalam ekstraksi total. Beberapa metode ekstraksi yang umumnya diterapkan meliputi infusa, dekokta, maserasi, soxhletasi, destilasi, dan refluks, perkolasi, ultrasonik (Marjoni, 2022).

2.2.3 Jenis-jenis Ekstraksi

1) Berdasarkan bentuk substansi dalam campuran

(1) Ekstraksi padat-cair

Ekstraksi padat-cair sering digunakan sebagai metode ekstraksi yang paling umum dalam mengisolasi suatu zat dari bahan alami. Proses ini memerlukan waktu kontak yang cukup lama antara zat padat dalam campuran dan pelarut. Keberhasilan ekstraksi dipengaruhi oleh sifat bahan alami dan zat yang ingin diekstraksi (Marjoni, 2022).

(2) Ekstraksi cair-cair

Proses ekstraksi cair-cair dilakukan ketika zat yang hendak diekstraksi berada dalam bentuk cairan dalam campurannya. (Marjoni, 2022).

2) Berdasarkan penggunaan panas

1) Ekstraksi secara dingin

Tujuan dari ekstraksi dingin adalah untuk mengekstraksi zat yang terkandung dalam tanaman mentah yang tidak berdaya terhadap intensitas atau termolabilitas. Proses ekstraksi dingin bisa dilakukan melalui berbagai metode yang berbeda, yaitu:

(1) Maserasi

Metode ekstraksi yang simpel dilakukan dengan cara merendam bahan mentah dalam satu jenis pelarut atau kombinasi pelarut, selama periode waktu tertentu dan menggunakan temperature kamar yang terlindungi dari sinar matahari secara langsung.

(2) Perkolasi

Perkolasi merupakan proses mengalirkan pelarut secara langsung ke atas simplisia untuk mengekstrak zat aktif dalam keadaan dingin selama jangka waktu tertentu.

2) Ekstraksi secara panas

(1) Dekokta

Proses dekokta memiliki kesamaan dengan proses infusa, namun perbedaannya terletak pada lama waktu pemanasan. Dalam dekokta pemanasan membutuhkan waktu lebih lama, yakni selama 30 menit pada temperatur 90°C. Penggunaan metode ini terbatas karena siklus ekstraksi kurang efektif yang tidak cocok untuk mengekstraksi senyawa yang rentan terhadap panas dan bersifat termobil.

(2) Refluks

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut pada saat pelarut tersebut mencapai titik didihnya, dalam jangka waktu tertentu, dan dengan volume pelarut yang telah ditentukan, dengan menggunakan kondensor (pembekap). Biasanya, proses ini diulang sebanyak 3-5 kali pada residu pertama untuk memastikan pencapaian hasil ekstraksi yang optimal.

(3) Soxhletasi

Soxhletasi merupakan proses ekstraksi dengan alat tertentu berupa ekstraktor Soxhlet. Temperatur yang digunakan pada ekstraksi ini lebih rendah jika dibandingkan dengan temperatur yang digunakan pada ekstraksi refluks.

3) Berdasarkan metode ekstraksi

(1) Ekstraksi tunggal

Proses ekstraksi tunggal dilakukan dengan mencampurkan bahan yang akan dipisahkan satu kali saja dengan menggunakan bahan yang dapat dilarutkan. Pada teknik ekstraksi ini, sebagian zat dinamis akan terpecah dalam zat terlarut hingga mencapai titik keseimbangan. Kelemahan dari ekstraksi ini rendemannya cenderung rendah.

(2) Ekstraksi multi tahap

Proses ekstraksi multistap dilakukan dengan mencampurkan bahan yang akan diekstrak beberapa kali menggunakan pelarut segar dengan jumlah yang sama. Metode ekstraksi ini menghasilkan rendemen yang lebih tinggi, karena terjadi beberapa langkah pencampuran dan pemisahan pada bahan yang diekstrak.

2.3 Tinjauan Maserasi

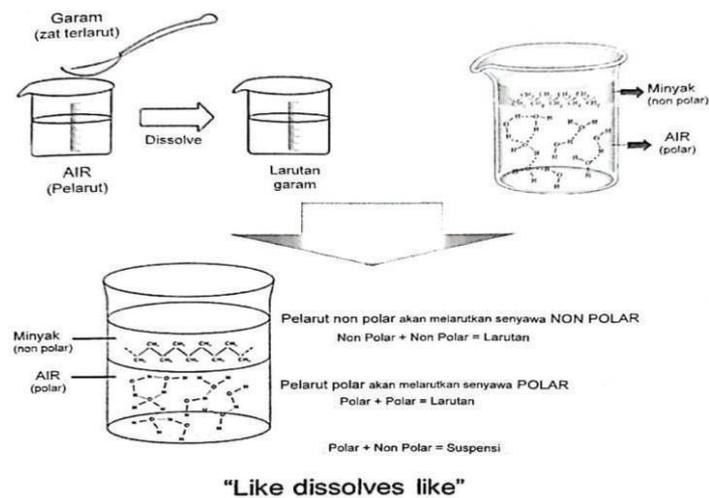
2.3.1 Pengertian Maserasi

Asal usul kata "Maserasi" berasal dari Bahasa Latin "*macerare*," yang mengacu pada tindakan merendam. Dalam konteks farmasi, istilah maserasi merujuk pada formulasi cair yang dibuat dengan merendam bahan mentah dalam pelarut yang sesuai tanpa pemanasan dengan suhu kamar atau ruang selama waktu tertentu dengan sesekali dilakukan pengadukkan atau pengocokkan (Marjoni, 2022). Tujuan dari pengadukkan dan pengocokkan yang berulang adalah untuk dapat mempercepat waktu larutan penyari dalam mengekstraksi sampel, metode maserasi ini digunakan bagi simplisia yang tidak tahan panas untuk menghindari kerusakan dan terurainya komponen-komponen kimia aktif (Handoyo, 2020). Faktor-faktor yang mempengaruhi ekstraksi antara lain yaitu, jenis pelarut, ukuran partikel, suhu, waktu, dan perbandingan antara bahan dan pelarut (Chairunnisa, dkk., 2019).

2.3.2 Prinsip Kerja Maserasi

Prinsip dasar maserasi melibatkan larutan zat dinamis mengingat

tingkat kelarutannya dalam zat yang dapat larut (gagasan "*like dissolved like*"). Sesuai standar "*like dissolved like*", campuran polar akan hancur dalam pelarut polar, sedangkan campuran non-polar akan terurai dalam pelarut non-polar. Cara paling umum untuk memisahkan campuran dinamis dapat dilakukan dengan menyerap komponen yang tidak dimurnikan dalam jumlah yang dapat larut selama beberapa hari pada suhu kamar dan menghindari paparan langsung terhadap sinar matahari. Zat terlarut yang digunakan untuk ekstraksi akan menyusup ke lapisan sel dan kemudian masuk ke dalam sel tumbuhan yang kaya akan zat aktif. Hubungan antara zat dinamis dengan zat terlarut menyebabkan hancurnya senyawa dinamis yang kemudian terurai dalam zat terlarut. (Marjoni, 2022).



Gambar 2.2 Prinsip *like dissolves like* (Marjoni., 2022)

Pelarut di dalam sel mengandung zat dinamis sedangkan di luar sel zat larut belum terisi zat dinamis. Hal ini mengakibatkan perbedaan sentralisasi zat dinamis di dalam sel dengan yang di luar sel. Ketidakseimbangan konsentrasi ini memberi energi pada penyebaran, di mana jawaban dengan fiksasi tinggi pada umumnya akan keluar dari sel dan

digantikan oleh jawaban dengan konsentrasi lebih rendah. Proses ini diulangi hingga tercapai pengelompokan keserasian susunan di dalam sel dan di luar sel (Marjoni, 2022).

2.3.3 Tinjauan Pelarut pada Ekstraksi

Pelarut merupakan zat yang ada dalam larutan dengan jumlah yang signifikan, sementara komponen lain disebut sebagai zat terlarut. Pemilihan pelarut dalam proses ekstraksi harus mempertimbangkan kesesuaian pelarut dengan zat aktif yang diperoleh dari bahan mentah, sehingga memungkinkan pemisahan zat aktif dari bahan mentah tersebut. Hasil dari proses ekstraksi ini adalah konsentrat sebagian yang mengandung zat dinamis ideal. Bahan terlarut yang digunakan dalam siklus ekstraksi memiliki beberapa sifat penting, di antaranya:

- 1) Kemampuan dalam melarutkan (*Solubility*)
- 2) Kecepatan dalam menguap
- 3) Trayek didih
- 4) Berat jenis (*specific gravity*)
- 5) Flashpoint

Syarat kriteria pelarut ideal untuk ekstraksi di antaranya:

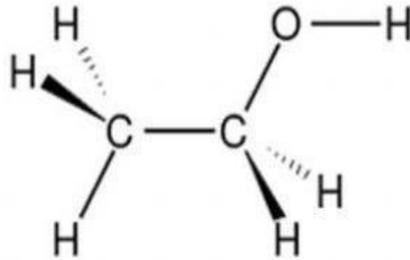
- 1) Selektivitas, yang berarti pelarut tersebut memiliki kemampuan untuk melarutkan semua zat dengan efisien dan menyeluruh, sambil juga mampumelarutkan bahan yang tidak diperlukan.
- 2) Titik didih seragam dan rendah.
- 3) Ramah lingkungan dan tidak toksik

- 4) Dapat mengekstrak senyawa yang terdapat pada simplisia.
- 5) Stabil secara fisik dan kimia.
- 6) Tidak mudah terbakar dan bersifat inert
- 7) Kemudahan dalam penghilangan dari ekstrak.
- 8) Tidak memicu reaksi antara senyawa dalam bahan mentah yang diekstrak..
- 9) Ekonomis atau murah

Jenis pelarut berdasarkan kepolaran:

- 1) Senyawa polar pelarut didefinisikan oleh rumus umum ROH, menunjukkan keberadaan atom hidrogen yang terikat pada atom elektronegatif (oksigen). Pelarut dengan tingkat polaritas yang tinggi adalah pelarut yang cocok untuk semua jenis senyawa aktif (universal) Selain mampu menarik senyawa polar, pelarut polar juga dapat menarik senyawa yang memiliki tingkat polaritas yang lebih rendah.
- 2) Pelarut semipolar merujuk pada pelarut dengan molekul yang tidak memuat ikatan O-H. Dalam kategori ini, semua molekul memiliki ikatan dipol yang signifikan, yakni ikatan rangkap antara karbon dengan oksigen atau nitrogen. Tingkat polaritas pelarut semipolar lebih rendah dibandingkan dengan pelarut polar. Pelarut semipolar cocok untuk melarutkan senyawa yang memiliki sifat semipolar.
- 3) Pelarut nonpolar mengacu pada senyawa yang memiliki konstanta dielektrik yang rendah dan tidak mampu larut dalam air. Jenis pelarut ini untuk mengekstraksi senyawa yang tidak larut dalam pelarut polar

2.4 Etanol



Gambar 2.3 Etanol (Wusnah dkk., 2019)

Etanol merupakan campuran etilalkohol dan air, mengandung 94,7 v/v atau 92,0% dan tidak lebih dari 95,2% v/v atau 92,7% C_2H_6O . Penggambaran etanol tidak jelas, jelas, tidak dapat diprediksi, dan serbaguna; memiliki aroma khas; terasa panas; Selain itu, mudah terbakar, menghasilkan api biru namun tidak berasap.

Etanol sangat mudah larut dalam air, dan dalam kloroform *P* dan eter *P*. Ia memiliki berat jenis 0,8119 hingga 0,8139. Untuk wadah dalam wadah yang tertutup rapat, terlindung dari cahaya, simpan di tempat sejuk, dan jauh dari api (Depkes, 1979).

Etanol bersifat larut polar, etanol tidak dapat memecah berbagai zat dinamis, hanya beberapa zat tertentu seperti minyak atsiri, glikosida, alkaloida, dan damar-damar. Etanol tidak dapat mengekstrak bahan dari beberapa jenis seperti albumin, gom, dan gula. Fungsi lain dari etanol juga dapat menghambat pertumbuhan jamur dan bakteri serta dapat menghambat kerja enzim. Penggunaan etanol sebagai pelarut dalam proses ekstraksi memiliki keuntungan dapat dihasilkan ekstrak yang spesifik, dan dapat bertahan lama selain menjadi pelarut

etanol dapat berguna untuk menjadi pengawet (Marjoni, 2016).

2.5 Kloroform

Kloroform mengandung 1,0% v/v hingga 2,0% v/v etanol sebagai spesialis kontrol. Permerian adalah cairan yang tidak stabil; tanpa warna; memiliki aroma khas; rasa manis; selanjutnya, mengkonsumsi, untuk solvabilitas, kloroform terurai di sekitar 200 bagian air; pelarut dalam etanol P langsung; pelarut dalam eter P; dapat larut dalam sebagian besar pelarut polar; pelarut dalam balsem peremajaan dan minyak berminyak, titik didihnya pada suhu 60°C-62°C, Penyimpanan dapat pada wadah tertutup baik tersumbat kaca; terlindung dari sinar matahari langsung, Kegunaannya sebagai anestetikum; pengawet; dan zat tambahan (Depkes, 1979).

2.6 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah metode yang digunakan untuk menganalisis komposisi senyawa metabolit opsional dalam suatu zat tertentu. Skrining fitokimia berfungsi sebagai langkah awal untuk mendapatkan gambaran tentang jenis senyawa yang terkandung dalam zat alami yang diperiksa. Pendekatan skrining fitokimia dapat dilakukan secara subyektif, semi subyektif, dan kuantitatif, sesuai dengan tujuan penyelidikan yang ideal. Pendekatan skrining fitokimia subjektif dapat dilakukan melalui respon pewarnaan dengan pemanfaatan reagen khusus. Salah satu elemen yang mempengaruhi konsekuensi dari skrining fitokimia adalah seleksi pelarut dan metode ekstraksi yang digunakan. Penentuan pelarut yang kurang dapat mengakibatkan campuran dinamis yang ideal tidak dapat dihilangkan dengan efisien dan menyeluruh (Vifta

dan Advistasari, 2018).

Menurut Marjoni, (2016) persyaratan yang harus dipenuhi dalam melakukan skrining fitokimia antara lain :

- 1) Metode yang digunakan sederhana.
- 2) Metode yang digunakan memerlukan waktu yang singkat dan cepat.
- 3) Metode yang digunakan dapat dilakukan dengan alat yang sederhana.
- 4) Selektif terhadap senyawa dipelajari.
- 5) Semikualitatif dan dapat memberikan keterangan ada atau tidaknya senyawa tertentu.

2.7 Alkaloid

Alkaloid adalah salah satu jenis metabolit opsional yang paling melimpah, yang ditandai oleh keberadaan atom nitrogen. Termasuk basa organik mengandung atom nitrogen yang terdapat pada jaringan hewan dan tumbuhan bersifat alkali dengan struktur lingkaran yang heterosiklik atau aromatis (Wahyuni and Marpaung, 2020). Alkaloid merupakan senyawa organik yang banyak ditemui dalam terdapat pada seluruh tumbuhan, alkaloid pada tumbuhan selain pada daun juga dapat ditemukan pada biji, buah, kulit kayu, akar, dan ranting (Alzanado dan Yusuf, 2022). Penggunaan alkaloid untuk pengobatan karena memiliki efek farmakologi dan fisiologis yang besar, salah satu ciri tanaman yang mengandung alkaloid yaitu memiliki rasa pahit (Mukhaimin dkk., 2018). Secara farmakologis, alkaloid memiliki banyak aktivitas biologis seperti, antiradang, antioksidan, dan antibakteri (Latief dkk., 2021).

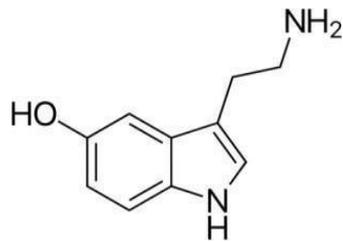
Alkaloid tidak memiliki tatanama sistematis, maka dari itu alkaloid

dinyatakan dengan trivial, contohnya morfin, stiknin, dan kuinin nama trivial ini menggambarkan alkaloida. Alkaloida beracun bagi manusia akan tetapi memiliki aktivitas fisiologi yang menonjol, dalam bidang pengobatan dipergunakan secara luas. Alkaloid berbentuk kristal sedikit yang berbentuk cairan misal (nikotina) pada suhu ruang, tidak berwarna, bersifat optis aktif, alkaloid diklasifikasikan berdasarkan pada kesamaan sumber molekul asalnya (Fri dan Buriko, 2022).

Secara biologis alkaloid adalah senyawa kimia biologis yang memiliki bentuk heterosiklik dan memiliki aktivitas farmakologi terhadap manusia dan hewan lainnya. Efek farmakologinya sangat kuat pada sistem mamalia dan organisme lainnya sehingga alkaloid memiliki dampak yang penting. Alkaloid mayoritas memiliki sifat basa, sifat ini ditentukan oleh keberadaan pasangan elektron pada nitrogen, dan keasaman alkaloid tergantung pada keberadaan elektron bebas di atom nitrogen (Depkes RI, 2013). Alkaloid dibagi menjadi:

- 1) Alkaloid sejati

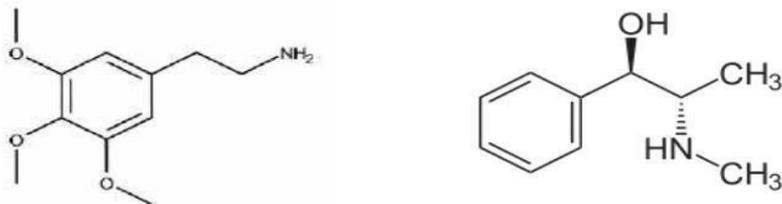
Alkaloid sejati dikenali sebagai racun; senyawa ini memperlihatkan aktivitas fisiologi yang beragam, hampir keseluruhan bersifat basa, berbentuk heterosiklik yang memuat nitrogen, dihasilkan dari asam amino, dan hadir pada tumbuhan dalam bentuk garam asam organik. Ada jenis alkaloid lain yang tidak bersifat basa dan tidak memiliki cincin heterosiklik, termasuk kelompok alkaloid kuartener yang cenderung bersifat asam. Contohnya adalah alkaloid serotonin.



Gambar 2.4 Struktur Serotin (Fri dan Buriko, 2022)

2) Protoalkaloid

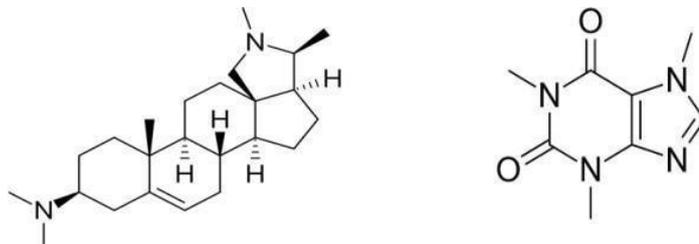
Protoalkaloid adalah asam amino yang agak basa dan nitrogennya tidak ditahan dalam cincin heterosiklik. Protoalkaloid diperoleh melalui jalur biosintetik dari asam amino yang memiliki karakter basa. Model menggabungkan mescaline dan efedrina.



Gambar 2.5 Struktur Meskalin dan Efedrina (Fri dan Buriko, 2022)

3) Pseudoalkaloid

Protoalkaloid adalah asam amino yang agak basa dan nitrogennya tidak ditahan dalam cincin heterosiklik. Protoalkaloid diperoleh melalui jalur biosintetik dari asam amino yang memiliki karakter dasar. Model menggabungkan mescaline dan efedrin (seperti kafein).



Gambar 2.6 Struktur Konessin dan Kafein (Fri dan Buriko, 2022)

2.8 Kafein

Kafein merupakan salah satu jenis alkaloid yang banyak ditemukan pada daun teh, biji kopi, dan biji coklat. Kafein termasuk golongan senyawa metilxatine yang terbentuk secara alami dan masuk dalam golongan derivat xatin yang merupakan senyawa alkaloid (Fajriana dkk., 2018). Kafein berbentuk anhidrat atau hidrat mengandung 1 molekul air. Sinonim kafein adalah 1,3,7

Trimetilxantine dan rumus molekul kafein ialah $C_8H_{10}N_4O_2$. Pemerian kafein berupa serbuk putih atau bentuk jarum mengkilat, tidak berbau, rasa pahit, memiliki titik lebur antara $235^{\circ} - 237^{\circ}C$, agak sukar larut dalam air dan etanol, sukar larut dalam eter, dan mudah larut dalam kloroform, dan berat molekul 194,9 gram/mol (Danasrayaningsih, 2015).



Gambar 2.7 Struktur Kafein (1,3,7- trimetilxantin) (Sabarni dan Nurhayati, 2019)

Kafein merupakan salah satu alkaloid heterosiklik pada golongan metilxatine, menurut definisi senyawa organik yang mengandung nitrogen dengan struktur dua siklik atau cincin. Molekul ini alami hadir dalam berbagai jenis tumbuhan sebagai metabolit sekunder yang berperan sebagai insektisida alami, mengeliminasi atau menghentikan aktivitas serangga yang memakan tumbuhan tersebut. (Wardani, 2021).

Kafein dibuat secara industri melalui ekstraksi dari tanaman atau campuran

tertentu. Gunanya untuk mengatasi permasalahan modern dan selanjutnya dimanfaatkan sebagai penambah cita rasa dalam bisnis makanan (Wardani, 2021). Kafein memiliki efek farmakologis yang memberikan manfaat klinis, seperti merangsang kompresi otot kardiovaskular, merangsang sistem sensorik fokus, dan mengendurkan otot polos terutama pada bronkus. (Fajriana dkk.,2018). Mengonsumsi kafein secara berlebihan dapat menyebabkan mual, tremor, hipertensi, kejang, insomnia, gelisah, dan gugup (Coffeefag, 2001).

2.9 Kromatografi Lapis Tipis

2.9.1 Definisi Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis halus (KLT) adalah teknik kromatografi yang mudah dan paling banyak digunakan. Metode ini melibatkan penggunaan perangkat keras dan bahan yang sederhana berupa wadah tertutup (*chamber*) yang diisi dengan pelarut dan lempeng KLT. Sebelumnya disarankan untuk optimasi dengan peralatan tersedia, sehingga pembagian yang efektif dan estimasi yang tepat dapat tercapai (Wulandari, 2011)

Dalam penerapannya langkah awal dapat dimulai dengan menempatkan volume kecil dari salah satu sampel ujung fase diam (lempeng KLT) agar membentuk zona awal. Setelah itu, sampel diizinkan untuk mengering. Ujung fase diam yang berisi zona awal direndam pada sebuah wadah (*chamber*) yang telah diisi dengan fase gerak terdiri dari pelarut tunggal yang dapat larut atau kombinasi dua hingga empat pelarut murni. (Wulandari, 2011).

Bila fase diam dan gerak telah dipilih secara akurat, bagian-bagian

dari contoh dapat bergerak dengan kecepatan yang berbeda-beda seiring fase gerak melewati fase diam. Fenomena ini dikenal sebagai ekstensi kromatogram. Setelah fase gerak mencapai batas optimal maka fase diam dapat dikeluarkan, sedangkan fase gerak terperangkap pada lempeng dihilangkan dan dikeringkan.

Zona yang terbentuk dapat dibedakan secara langsung atau dengan menggunakan cahaya terang, terlepas dari reagen pengurai noda yang masuk akal. (Wulandari, 2011).

Hasil dari perbedaan tingkat afinitas berupa perbedaan dalam migrasi saat melewati fase diam dan fase gerak. Kecepatan migrasi ini melibatkan sejumlah mekanisme pemisahan yang berbeda. Kecepatan migrasi komponen sampel ditentukan oleh sifat fisika-kimia dari fase diam, fase gerak, dan komponen sampel itu sendiri. Selektivitas dan retensi dalam kromatografi ditentukan oleh interaksi antara fase diam, fase gerak, dan komponen sampel, yang melibatkan ikatan hidrogen, pasangan pemberi elektron, pasangan penerima elektron (transfer muatan), ikatan ion-dipol, ikatan ion-ion, dan ikatan van der Waals (Wulandari, 2011).

Pengambilan sampel, pemurnian sampel, dan pengawetan merupakan tantangan umum dalam KLT dan teknik kromatografi lainnya. Sebagai contoh, dalam pengembangan KLT, tidak selalu cukup hanya dengan melarutkan analit yang terdapat pada lempeng, kecuali bila dilakukan pemurnian sebelumnya (clean up). Metode yang sering digunakan dalam kromatografi dan ekstraksi selektif adalah clean up. KLT

memiliki kemampuan untuk menangani sampel yang terkontaminasi, sehingga keseluruhan kromatogram dapat dievaluasi. Selain itu, metode ini dapat memperpendek waktu dalam pemrosesan sampel, mengurangi biaya, dan waktu yang dibutuhkan. Kemungkinan adanya pengotor atau partikel yang terperangkap dalam fase diam tidak menjadi masalah, karena lempengnya hanya digunakan dalam satu kali penggunaan (Wulandari, 2011).

Deteksi senyawa menjadi lebih mudah jika senyawa tersebut memiliki sifat warna atau dapat menyerap sinar ultraviolet (UV). Untuk senyawa yang tidak memiliki sifat tersebut, penggunaan pereaksi penampak noda melalui perendaman atau penyemprotan diperlukan untuk menghasilkan senyawa turunan yang dapat mengeluarkan cahaya fluoresensi, terutama untuk senyawa aromatik yang terkonjugasi, senyawa tak jenuh dan dapat menyerap sinar UV. Fase diam dapat diimpregnasi indikator fluoresensi dan dapat dideteksi dibawah sinar UV 254 nm (Wulandari, 2011).

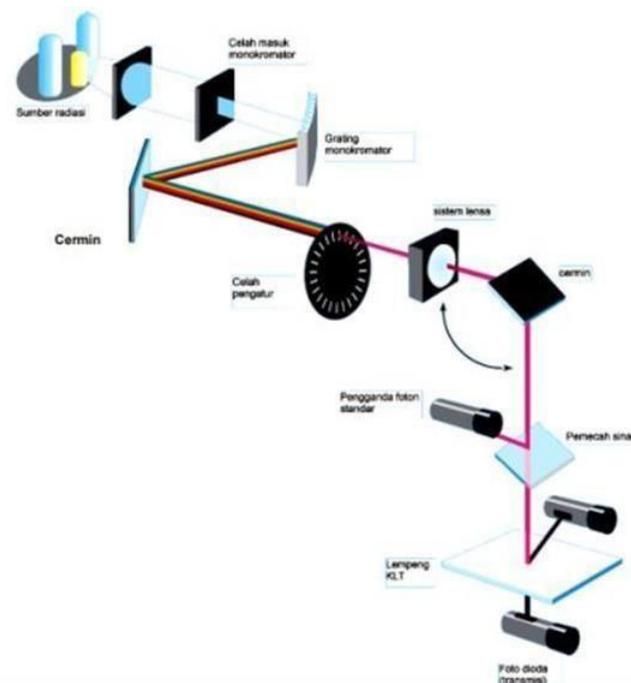
Identifikasi suatu senyawa sering didasarkan pada perbandingan nilai R_f (retardation factor) dibandingkan dengan nilai R_f standar. Meskipun demikian, nilai R_f dapat bervariasi antara laboratorium yang berbeda dan bahkan dalam analisis yang berbeda pada laboratorium yang sama, bahkan meskipun pada waktu yang berbeda. Faktor yang dapat mempengaruhi nilai R_f antara lain, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, dimensi dan jenis ruang, kondisi kesetimbangan, sifat

dan ukuran lempeng, kelembapan, dan persiapan pada sampel KLT sebelumnya (Wulandari, 2011).

Nilai R_f merupakan parameter yang menyatakan senyawa yang terdapat pada KLT telah bermigrasi. *Retardation factor* menggambarkan bahwa noda yang terdapat pada fase diam telah dielusi. Dalam menentukan nilai R_f analit dengan membandingkan jarak antara migrasi fase gerak (eluen) dan migrasi noda analit (Wulandari, 2011).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Identifikasi senyawa dapat dilakukan dengan menggoreskan noda pada lempeng KLT, lalu mengelusikan analit pada lempeng tersebut. Kemudian, senyawa yang ada pada lempeng dapat diidentifikasi dengan menggunakan teknik spektrofotometri inframerah (IR), spektrofotometri resonansi magnet inti (NMR), spektrofotometri massa, atau metode spektrofotometri lain yang memiliki data elusi yang ada. Metode identifikasi ini memungkinkan penandaan langsung pada zona pada lapisan (in situ) lempeng KLT (Wulandari, 2011).



Gambar 2.8 Skema Sistem Optik Densitometri (CAMAG) (Wulandari, 2011)

Sumber radiasi pada sistem optik densitometri dapat menggunakan sinar UV (lampu deuterium), sinar VIS (lampu tungsten), sinar fluoresensi (lampu merkuri). Sinar yang dipancarkan memiliki spektrum warna yang beragam dan bisa melewati monokromator. Di dalam monokromator, sinar dipecah menjadi sinar dengan satu warna menggunakan metode grating. Cahaya dengan satu warna ini kemudian dipantulkan oleh cermin untuk mencapai objek yang sedang dianalisis (lempeng KLT). Cahaya tersebut bisa diarahkan ulang atau dibiarkan melewati objek. Cahaya yang telah melewati objek akan ditangkap oleh fotomultiplier, perangkat yang berfungsi untuk meningkatkan intensitas cahaya yang tiba hingga mendapatkan hasil elektron yang terbaca oleh sistem komputer berperan sebagai output (Wulandari, 2011).

Interaksi REM terjadi saat cahaya REM mengenai molekul

senyawa pada noda. Ini menentukan jumlah cahaya yang diserap, dilewatkan, dan dipantulkan oleh noda analit dari REM awal. Jika fase diam tidak memiliki noda, cahaya yang jatuh akan dipantulkan kembali. Jika fase diam memiliki noda, sebagian cahaya akan diserap dan intensitas pantulan akan berbeda dari intensitas cahaya yang masuk. Evaluasi noda KLT dengan densitometri menggunakan analisis kuantitatif. Sinyal dari setiap noda analit dapat diukur dengan membandingkannya dengan sinyal dari area tanpa noda (blanko). Ketika koefisien scattering dianggap nol ($S=0$), konsentrasi akan sejajar dengan tanggapan detektor. Prinsip ini menunjukkan bahwa keseragaman partikel sorben dan ketebalan sorben pada lempeng KLT akan memengaruhi hasil analisis kuantitatif (Wulandari, 2011).

2.9.2 Tujuan Penggunaan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis dapat digunakan secara luas terutama pada bidang farmasi, forensik, biokimia, klinis yang dapat digunakan secara kualitatif maupun kuantitatif. Kromatografi lapis tipis memerlukan absorben (zat padat sebagai penyerap) sebagai fase diam dan larutan pengembang (zat cair) sebagai fase gerak. (Marjoni, 2016).

Tujuan penggunaan Kromatografi Lapis Tipis antara lain, untuk mencapai hasil dalam bentuk kualitatif, kuantitatif, dan preparatif. Untuk menemukan sistem pelarut yang sesuai dalam kromatografikolom.

2.9.3 Sistem Kromatografi Lapis Tipis

1) Fase Diam

Fase diam merupakan lapisan tipis berupa bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga yang datar dibantu oleh bahan pengikat. Kromatografi lapis tipis dapat menggunakan beberapa bahan sebagai fase diam antara lain silika gel, selulosa, alumina, dan kieselguhr. Setidaknya pada fase gerak harus mengandung sedikit mungkin air, karena pada titik penyerapan dapat ditepatti oleh air sehingga tidak akan terdapat senyawa yang melekat. Sebelum digunakan lempeng KLT dapat diaktivasi melalui pemanasan pada suhu 110° selama 30 menit (Marjoni, 2016).

Penggunaan fase diam berupa silika gel dapat disebut asam siklik, dan kieselgel biasanya terbuat dari endapan larutan silikat dengan penambahan asam. Silika termasuk dalam kategori bahan berpori besar, dan dimensi pori memiliki dampak signifikan terhadap selektivitas karena dapat memodifikasi kecepatan migrasi dan resolusi komponen sampel. Ukuran pori yang sering diterapkan pada KLT meliputi $40, 60, 80,$ dan 100° dan untuk kisaran ukuran partikel silika gel untuk KLT biasanya antara 5-40 mm dengan keseragaman rata-rata 10-15 mm (Wulandari, 2011).

2) Fase Gerak

Fase gerak terdiri dari sejumlah pelarut dan bisa mengaplikasikan sistem pelarut campuran jika perlu. Dalam tujuan

memisahkan senyawa organik, sering kali digunakan campuran pelarut untuk mencapai sistem pengembang yang cocok, dengan akhirnya menghasilkan pemisahan senyawa yang lebih efisien (Marjoni, 2016). Faktor pada pemilihan eluen yang berpengaruh pada sistem KLT, dalam penggunaan pelarut campuran harus saling campur dan tidak boleh terdapat tanda-tanda kekeruhan. Agar mendapatkan eluen yang cocok dapat dilakukan optimasi terlebih dahulu (Wulandari, 2011).

2.10 Densitometri

Densitometri merupakan metode analisis instrumental yang digunakan untuk menentukan analit, baik secara kualitatif maupun kuantitatif, melalui interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT. Pendekatan ini dikenal sebagai KLT-Densitometri. Dalam penentuan analit menggunakan KLT-Densitometri secara kualitatif, perbandingan nilai R_f analit dan nilai R_f standar dapat dilakukan. Secara kuantitatif, analisis dilakukan melalui perbandingan luas area noda analit dengan luas area noda standar yang telah diketahui konsentrasinya pada fase diam, atau dengan menghitung densitas noda analit dan membandingkannya dengan densitas noda standar (Wulandari, 2011).

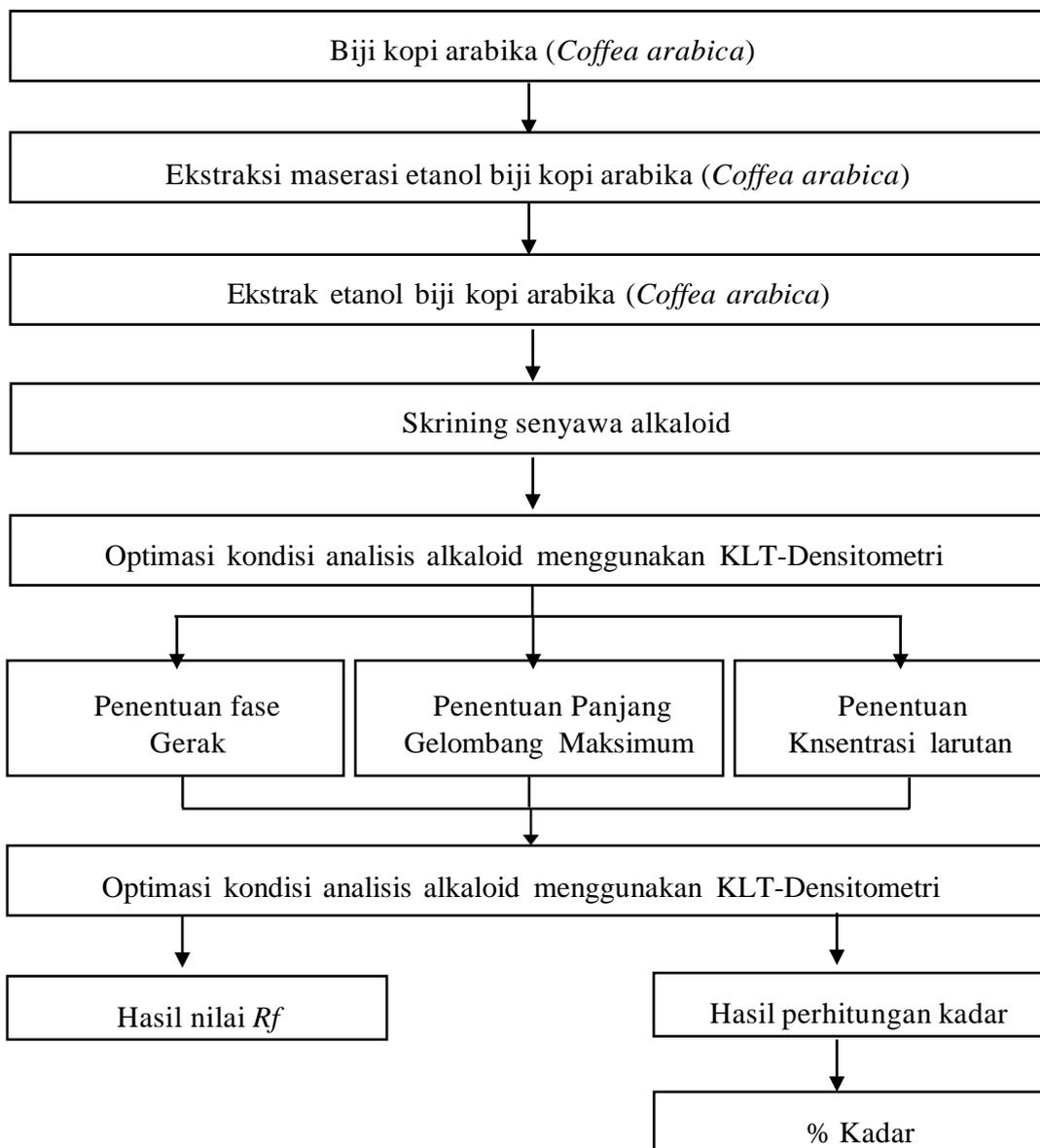
Dalam metode KLT-Densitometri parameter kuantitatif yang digunakan meliputi tinggi puncak kurva dan luas di bawah puncak kurva densitometri. Densitometer memiliki dua mode, yaitu mode reflektan (remisi) dan mode transmitan. Pada mode reflektan, rentang spektral UV/Vis, fluoresensi, dan perendaman fluoresensi digunakan (Wulandari, 2011). Pada spektral visual

dengan rentang panjang gelombang 200-400 nm memakai lampu halogen dan tungsten, pada spektral UV dengan rentang 190-400 nm dengan menggunakan lampu deuterium dan xenon, dan pada spektral fluoresensi dapat menggunakan lampu merkuri yang terdapat pada instrument densitometer (Wulandari, 2011).

BAB 3 KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep

Kerangka konsep adalah keterkaitan antara teori atau konsep yang dapat mendukung dalam melaksanakan penelitian digunakan untuk pedoman dalam menyusun sistematis dari penelitian.



Gambar 3.1 Kerangka konsep analisis dan penetapan kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kopi arabika (*Coffea arabica*) dengan metode KLT-Densitometri

3.2 Hipotesis

Hipotesis merupakan jawaban sementara dari rumusan masalah yang menjadi objek penelitian. Berdasarkan kerangka konseptual tersebut didapatkan hipotesis pada penelitian ini adalah terdapat kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kopi arabika (*Coffea arabica*) dengan analisis penetapan kadar alkaloid total dengan menggunakan KLT-Densitometri.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan yaitu deskriptif secara kualitatif dan kuantitatif dengan metode eksperimental laboratorium. Penelitian yang dilakukan berupa analisis kadar alkaloid total ekstrak etanol kopi arabika (*Coffea arabica*) dengan menggunakan KLT-Densitometri. Ekstraksi biji kopi arabika menggunakan metode maserasi. Kadar alkaloid total ditentukan menggunakan KLT-Densitometri.

4.2 Populasi

Populasi merujuk pada seluruh objek penelitian yang hendak diteliti. (Sugiyono, 2008). Populasi yang menjadi focus dalam penelitian ini ialah tanaman kopi arabika (*Coffea arabica*).

4.3 Sampel

Sampel merupakan sebagian dari jumlah dan ciri-ciri yang terdapat dalam populasi tersebut (Sugiyono, 2008). Sampel dalam rangka penelitian ini ialah biji kopi arabika (*Coffea arabica*) yang diambil dari puslitkoka Jember.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini variable bebas yang digunakan adalah ekstrak etanol dari kopi arabika (*Coffea arabica*) dan optimasi analisis berupa penentuan konsentrasi, penentuan panjang gelombang maksimum, dan penentuan fase gerak.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar alkaloid total menggunakan KLT-Densitometri berupa hasil nilai Rf dan nilai % kadar alkaloid total.

4.5 Tempat Penelitian

Tempat penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Universitas dr. Soebandi untuk melaksanakan ekstraksi maserasi atau pemrosesan sampel dari bahan baku biji kopi arabika (*Coffea arabica*). Selanjutnya, proses berlanjut di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember pada proses analisis kadar alkaloid total.

4.6 Waktu Penelitian

Untuk waktu pelaksanaan penelitian dimulai bulan Mei – Juni 2023

4.7 Definisi Operasional

Tabel 41 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Skala	Hasil
Variabel Bebas (<i>Independent</i>)					
Ekstrak etanol 96% biji kopi arabika (<i>Coffea arabica</i>)	Hasil ekstraksi biji kopi arabika (<i>Coffea arabica</i>) dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%	Menghitung % rendemen	Timbangan analitik	Rasio	Hasil dalam satuan %
Penentuan Konsentrasi	Suatu tindakan dalam memperkirakan kandungan alkaloid total dalam sampel biji kopi arabika (<i>Coffea arabica</i>)	Penentuan Konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 Ppm	KLT-Densitometri	Ordinal	Hasil dalam satuan ppm
Penentuan	Merupakan	Penentuan	KLT-Densitometri	Ordinal	Hasil dalam

Panjang Gelombang Maksimum	tindakan dalam memberikan kepekaan dalam sampel biji kopi arabika (<i>Coffea arabica</i>)	panjang gelombang 200-400 ppm dengan KLT-Densitometri			satuan nm
Penentuan Fase Gerak	Merupakan tindakan untuk membandingkan komposisi dan terbaik hingga mendapatkan hasil pemisahan yang maksimal	Penentuan fase gerak menggunakan fase gerak penelitian sebelumnya, yaitu: 1) Etil asetat : Metanol (8 :2) v/v (Verawati, dkk., 2016) 2) Kloroform : etanol (96:4) v/v (Budiman, dkk., 2014) 2.10.2.1 Kloroform : metanol (9:1) v/v (Kadek, dkk., 2021)	KLT-Densitometri Ordinal	Hasil berupa perbandingan	komposisi dan volume mL
Variabel Terikat (<i>Dependent</i>)					
Nilai Rf	Nilai Rf suatu pemisahan untuk membedakan senyawa dalam ekstrak biji kopi arabika (<i>Coffea arabica</i>)	Larutan standart kafeindan sampel ditotolkan dilempeng KLT yang sama berukuran 10x10 dengan batas atas dan bawah 1 cm dan dibuat jarak antar totolan sepanjang 1 cm. Alat untuk penotolan sendiri adalah mikropipet dengan ukuran 1µl. Larutan standart dan sampel ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktivasi dan dilakukan replikasi 5 kali	KLT-Densitometri	Rasio	Nilai Rf (0,2-0,8)

		<p>pada standart dan 3 kali pada sampel. Lalu, lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) dicelupkan ke dalam ruang yang sudah dijenuhi dengan zat sampa mencapai jarak 75mm. Setelah itu, lempeng dikeringkan dengan cara dibiarkan terkena udara sampai kering. Selanjutnya, zat yang ada di lempeng dapat dideteksi menggunakan instrumen densitometri padapanjang gelombang puncaknya yang diperoleh.</p>			
Nilai % kadar alkaloid total	Nilai % kadar alkaloid total merupakan perhitungan untuk menetapkan jumlah alkaloid total pada ekstrak etanol biji kopi arabika (<i>Coffea arabica</i>)	<p>Larutan standart kafein dan sampel Ditotolkan Dilempeng KLT yang Sama Berukuran 10x10 dengan batas atas dan bawah 1 cm dan dibuat jarak antar Totolan sepanjang 1 cm. Alat Utuk Penotolan sendiri adalah Mikropipet dengan ukuran 1µl. Larutan standart dan Sampel Ditotolkan</p>	KLT-Densitometri	Rasio	% Kadar alkaloid total

pada lempeng
KLT yang
Telah
diaktivasi dan
Dilakukan
replikasi 5 kali
pada standart
dan 3 kali
pada sampel.
Lempeng KLT
Kemudian
Direndam
dalam ruangan
yang telah
diisi dengan
zat sampai
Mencapai
jarak 75 mm.
Setelah itu,
Lempeng
Dikeringkan
dan dapat
Dideteksi
Menggunakan
Densitometri
pada panjang
Gelombang
Maksimum
yang terukur

4.8 Teknik Pengumpulan Data

4.8.1 Determinasi Tanaman

Determinasi jenis tanaman biji kopi arabika ini dilakukan di fasilitas Laboratorium Politeknik Negeri Jember dengan membawa bagian tanaman biji kopi arabika (*Coffea arabica*). Determinasi tanaman biji kopi arabika ini dilakukan untuk mengetahui identitas tanaman yang digunakan benar-benar jenis spesies *Coffea arabica* dan termasuk family *Rubiaceae*. Determinasi dilakukan untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan bahan untuk penelelitian.

4.8.2 Pengambilan Sampel

Sampel biji kopi arabika diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan

Kakao di Kabupaten Jember. Sampel yang digunakan yaitu bagian biji dari kopi arabika yang sudah diolah menjadi serbuk.

4.8.3 Ekstraksi Sampel

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi maserasi. Serbuk biji kopi arabika (*Coffea arabica*) ditimbang sebanyak 100 gr, setelah ditimbang serbuk biji kopi arabika diletakkan kedalam toples kaca, lalu maserasi dengan menggunakan 1000 ml etanol 96% hingga semua serbuk biji kopi arabika terendam kemudian tutup rapat toples. Dilarutkan selama 3 x 24 jam hindari dari paparan sinar matahari secara langsung, sambil diaduk secara berkala untuk memastikan proses ekstraksi berjalan secara optimal, lalu dilakukan penyaringan untuk memisahkan antara ampas dan cairan hasil ekstraksi. Semua cairan yang telah disaring digabungkan dan selanjutnya diuapkan menggunakan alat evaporator pada suhu 60° hingga diperoleh ekstrak etanol kopi arabika (Sunnah, dkk., 2021).

4.8.4 Uji Alkaloid

Uji alkaloid menggunakan tiga 3 pereaksi, yaitu mayer, bouchardat, dan dragendorff. Sampel diambil 0,5 gr ditambah 9 ml akuades, dipanaskan diatas penangas air selama kurang lebih 2 menit, lalu didinginkan dan disaring kemudianditambah 1 ml asam klorida 2 N. Filtrat hasil penyaringan digunakan untuk menguji kandungan alkaloid. Sebanyak tiga tabung reaksi diambil, kemudian dalam setiap tabung reaksi dimasukkan 0,5 ml filtrat. Pada setiap tabung reaksi tersebut ditetesi reagen sebanyak dua tetes, lalu dapat diamatti hasilnya (Sulistyarini, dkk., 2019).

Tabel 4.2 Larutan Pereaksi Atau Reagen

Reagen	Hasil
Mayer	Hasil positif alkaloid dengan menggunakan reagen mayer ditunjukkan dengan terdapat endapan putih kekuningan.
Dragendrof f	Hasil positif alkaloid dengan menggunakan reagen dragendroff ditunjukkan dengan terdapat endapan jingga
Bouchardat	Hasil positif alkaloid dengan menggunakan reagen bouchardat ditunjukkan dengan terdapat endapan coklat.

4.8.5 Penetapan Kadar Alkaloid Menggunakan KLT-Densitometri

4.8.5.1 Optimasi Alkaloid Total Menggunakan KLT-Densitometri

1) Penentuan fase gerak

Pemilihan fase gerak yang akan digunakan untuk penelitian ini berdasarkan optimasi penelitian sebelumnya yaitu:

(1) Fase gerak etil asetat : metanol (8 : 2) v/v (Verawati, dkk., 2016).

(2) Fase gerak kloroform : etanol (96 : 4) v/v menurut (Budiman, dkk., 2014).

(3) Fase gerak kloroform : metanol (9 : 1) v/v menurut (Kadek, dkk., 2021).

(4) Penentuan panjang gelombang

Proses optimalisasi panjang gelombang dilakukan dengan memindai noda analit menggunakan Camag TLC Scanner dengan bantuan perangkat lunak program Vision CATS. Penentuan panjang gelombang yang optimal dilakukan dalam rentang 200-400 nm. Penentuan panjang gelombang yang optimal didasarkan pada panjang gelombang di mana intensitas spektrum memiliki nilai tinggi (Kadek dkk., 2021)

(5) Penentuan konsentrasi

Penentuan konsentrasi dapat dilakukan optimasi terlebih dahulu yang dapat menunjukkan perkiraan kandungan alkaloid pada biji kopi arabika (*Coffea arabica*) konsentrasi uji yang dipilih yaitu 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm. Untuk memfasilitasi proses persiapan sampel, konsentrasi uji yang dipilih untuk proses optimalisasi adalah pada tingkat konsentrasi yang relatif tinggi, (Ariel Stanley, 2018).

2) Aktifasi Lempeng KLT Silika Gel F₂₅₄

Dalam mengaktifkan lempeng KLT, digunakan silika gel 60 F254 dengan ukuran 20×20 cm. Kemudian lempeng dipotong 10x10 cm. Lempeng KLT diaktivasi dengan pemanasan di oven menggunakan suhu 110°C selama kurang lebih 30 menit (Milanda, 2021).

3) Penjenuhan Chamber

Fase gerak yang akan digunakan perlu dilakukan optimasi terlebih dahulu agar didapatkan hasil pemisahan antara standart dan sampel yang baik. Setelah dilakukan optimasi maka fase gerak yang terpilih dapat dituangkan dalam bejana/chamber, kertas saring dimasukkan ke dalam wadah yang berisi fase gerak. Wadah tersebut kemudian ditutup dan fase gerak dibiarkan menguap sampai mampu meresap ke dalam kertas saring,

biasanya sekitar 1 jam, atau ketika tinggi fase gerak telah mencapai sekitar tujuh perdelapan dari tinggi kertas saring. (Milanda, 2021).

4) Pembuatan Larutan Baku Kafein

Baku kafein ditimbang sebanyak 50 mg. Kafein dilarutkan menggunakan pelarut kloroform dengan kualitas *proanalysis grade* hingga mencapai tanda batas pada labu takar 25 ml. Hal ini dilakukan untuk menghasilkan larutan stok kafein dengan konsentrasi 2000 ppm (Milanda, 2021).

5) Pembuatan Larutan Standart Kafein

Larutan standar kafein disusun dengan tiap konsentrasi 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm (Setyaningrum dkk., 2022).

Tabel 4. 3 Preparasi Larutan Standart Kafein

Konsentrasi Larutan Standart Kafein	Keterangan
2000 ppm (Baku Kafein)	Timbang 50 mg kafein ad 25 mL kloroform
200 ppm	Larutan baku ekstrak diambil 0,5 mL ad 5 mL Kloroform
400 ppm	Larutan baku ekstrak diambil 1 mL ad 5 mL Kloroform
600 ppm	Larutan baku ekstrak diambil 1,5 mL ad 5 mL Kloroform
800 ppm	Larutan baku ekstrak diambil 2 mL ad 5 mL Kloroform
1000 ppm	Larutan baku ekstrak diambil 2,5 mL ad 5 mL kloroform

6) Pembuatan Larutan Sampel

Timbang 25 mg ekstrak etanol kopi arabika, kemudian masukkan kedalam labu ukur 5 ml lalu tambahkan etanol ad hingga tanda batas

(Farmakope Herbal Indonesia Edisi II Tahun, 2017).

7) Penentuan Nilai Rf

Nilai Rf yaitu jarak yang ditempuh zat terlarut dan jarak yang ditempuh pelarut. Hasil nilai Rf alkaloid biasanya berkisar antara 0,2-0,8 nilai Rf dipengaruhi oleh eluen karena dipengaruhi oleh tingkat kepolarannya (Kapondo dkk., 2020).

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

8) Penentuan Kurva Baku

Larutan standar kafein konsentrasi 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm dengan replikasi 3 kali sampel ditotol dengan mikropipet ukuran sebanyak 5 μ l pada lempeng KLT yang sudah diaktivasi pada oven dengan suhu 110 $^{\circ}$ selama 30 menit. Penerapan sampel pada lempeng KLT yang sama, yang terbuat dari silika gel 60 F254 dan memiliki dimensi 20 x 20 cm, diambil potongan berukuran 10 x 10 cm. Proses penerapan sampel dilakukan pada lempeng KLT yang diberi batas atas dan bawah sepanjang 1 cm dan jarak antar totolan sepanjang 1 cm (Milanda, 2021).

9) Analisis Hasil KLT-Densitometri

Setelah dilakukan penotolan pada lempeng KLT, kemudian lempeng KLT dielusi pada chamber yang telah dijenuhkan dengan fase gerak yang telah dioptimasi terlebih dahulu, lalu dielusi hingga jarak 75 mm. Selanjutnya plat dapat diangkat, lalu diangin-anginkan untuk diuji menggunakan densitometer λ_{maks} kafein dan panjang gelombang serapan yang telah diukur sebelumnya diterapkan pada sampel. Data hasil yang diperoleh dari perangkat densitometri dianalisis dalam bentuk densitogram yang mengandung nilai Rf dan luas area yang beragam. Densitogram hasil diambil rata-ratanya dari tiga kali pengulangan untuk setiap sampel. Rata-rata luas area ini dimasukkan ke dalam persamaan kurva kalibrasi berbentuk $y = bx + a$ yang berlaku dalam daerah linear,

sehingga dapat diketahui massa alkaloid yang didapatkan pada masing-masing sampel (Stanley, 2018).

Hasil persamaan regresi didapatkan dengan cara membuat persamaan kurva baku yaitu X (Konsentrasi analit) dan Y (Luas area) yang didapatkan dari pembacaan lempeng KLT pada instrument densitometer. Setelah diperoleh perhitungan regresi linear dapat dilanjutkan dengan perhitungan % kadar alkaloid total. Kemudian dilakukan perhitungan standar deviasi (SD) untuk membandingkan akurasi hasil. Semakin rendah nilai SD dari rangkaian pengukuran menunjukkan tingkat ketepatan yang lebih tinggi dari metode yang digunakan. dan data yang diperoleh dengan sebanyak 3 kali pengulangan. Sedangkan nilai RSD yang semakin kecil analit, maka semakin besar nilai RSD yang diperoleh. Menurut *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC) nilai %RSD pada presisi keterulangan (*Repeability*) analisis yang baik dengan dengan konsentrasi yang kurang dari 5% (CIPAC,2003).

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Ekstraksi Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

Determinasi tanaman biji kopi arabika yang telah dilakukan di Politeknik Negeri Jember menyatakan bahwa benar tanaman yang dipergunakan untuk penelitian merupakan bagian biji kopi arabika (*Coffea arabica*) dan hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 3.

Pada proses ekstraksi maserasi selama 3 x 24 jam ditambah dengan proses remaserasi selama 1 x 24 jam didapatkan hasil maserasi dan remaserasi yang bisa dilihat pada Tabel 5.1:

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Randemen Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika(*Coffea arabica*)

Hasil Ekstrak Kering	Hasil Penimbangan
Berat Serbuk Awal (g)	100
Berat Cup Kosong (g)	3.46
Berat Cup Kosong (g) + Ekstrak kering	14.30
Berat Ekstrak Kering	10.84
% Randemen	10.84%

5.2 Uji Alkaloid

Hasil dari uji alkaloid dengan menggunakan tiga pereaksi, berikut ini adalah hasil dari uji alkaloid bisa dilihat pada tabel 5.2:

Tabel 5.2 Hasil Uji Alkaloid Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

Nama Pereaksi	Terdapat (+) / Tidak Terdapat (-)	Perubahan Yang Terjadi
Mayer	+	Terdapat Endapan putih
Dragendroff	+	Terdapat endapan berwarna Jingga

Bauchardat

+

Terdapat endapan berwarna

Coklat

5.3 Optimasi Kondisi Analisis Kadar Alkaloid Total

1) Penentuan fase gerak

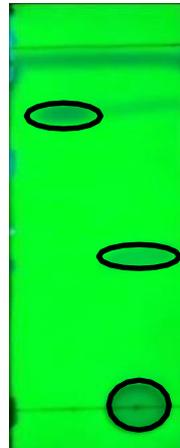
Pada penelitian ini dilakukan percobaan optimasi fase gerak 3 kali.

Pada gambar 5.1 dapat dilihat fase gerak tidak dapat memisah standar maupun sampel.



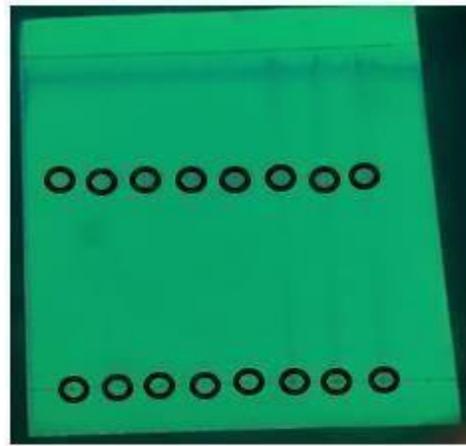
Gambar 5. 1 Fase gerak kloroform : etanol (96 : 4) v/v

Pada percobaan optimasi kedua fase gerak dengan menggunakan kloroform:metanol (9 : 1). Dapat dilihat pada gambar 5.2 bahwa larutan standart tidak dapat memisah sedangkan larutan sampelnya dapat memisah.



Gambar 5.2 Fase gerak kloroform:metanol (9:1) v/v

Dalam penelitian ini fase gerak diperoleh dengan menggunakan campuran etil asetat:metanol (8:2) v/v pada percobaan ketiga. Dapat dilihat pada gambar 5.3.



Gambar 5.3 Fase gerak etil asetat : metanol (8:2) v/v

Hasil optimasi fase gerak yang diperoleh sudah sesuai rentang antara standart dan sampel dapat memisah dengan baik hingga pertengahan lempeng tidak dekat dengan batas bawah tempat penotolan dan tidak jauh hingga batas atas.

Fase gerak : Etil asetat : Metanol (8:2)

Fase diam : Silika gel F₂₅₄

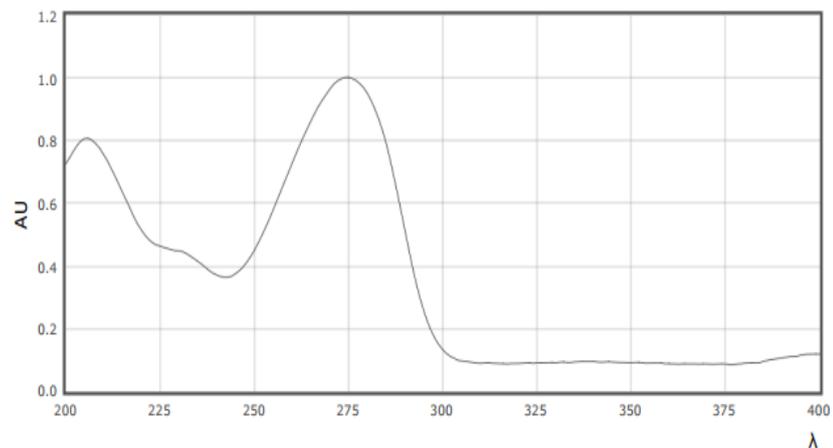
Bercak standart: Standart 1, 2, 3, 4, 5 (Kiri kekanan)

Bercak sampel : Sampel 6, 7, 8 (Kiri kekanan)

Deteksi : Uv 275

1) Penentuan panjang gelombang

Hasil pengamatan spektrum yang telah dilakukan pembacaan panjang gelombang pada penelitian ini memperoleh hasil maksimum sebesar 275 nm. Dalam rentang 200 – 400 nm dapat dilihat pada gambar 5.4:



Gambar 5.4 Panjang gelombang maksimum (275 nm)

Panjang gelombang dipilih berdasarkan perbandingan antara panjanggelombang (x) dan luas area (y), yang menghasilkan puncak tertinggi dalamgrafik yaitu 275 nm.

Maka penelitian ini menggunakan panjang gelombang 275 nm.

2) Penentuan konsentrasi

Pada saat optimasi konsentrasi diperoleh hasil optimasi konsentrasisebesar 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm dengan menggunakan penotollan sebesar 5 μ l dan konsentrasi sampel dengan 3 replikasi sampel yaitu 5000 ppm, 5000 ppm, 5000

ppm. Optimasi konsentrasi ini dilakukan agar mendapatkan nilai R_f yang sesuai dan didapatkan rentang konsentrasi yang tidak terlalu dekat dengan standarnya.

5.4 Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

1) Hasil Nilai R_f

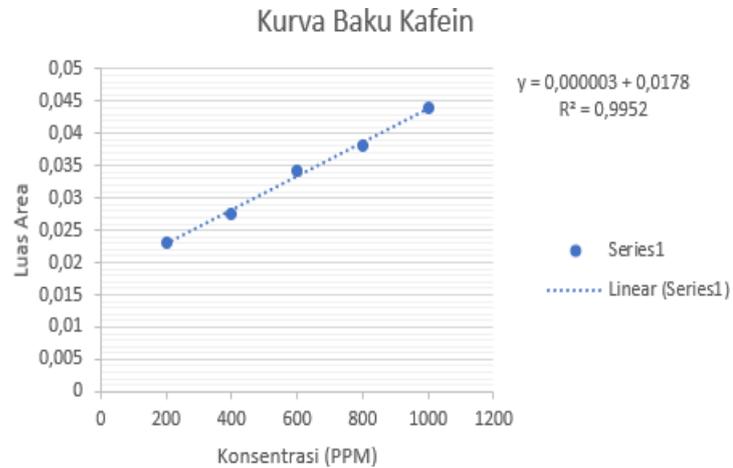
Dalam penelitian ini, terdapat lima seri standar dan tiga seri sampel yang diekstraksi dengan menggunakan fase gerak etil asetat : metanol (perbandingan 8:2) v/v, dan menggunakan fase gerak silika gel F254. Hasil pengukuran nilai R_f dapat ditemukan di Tabel 5.3:

Tabel 5.3 Data Nilai Luas Area dan Nilai R_f

Vial ID	Luas Area	R_f
S1	0.02322	0.605
S2	0.02764	0.610
S3	0.03416	0.615
S4	0.03806	0.620
S5	0.04408	0.623
S6	0,02358	0.601
S7	0,02412	0.603
S8	0,02499	0.603

2) Hasil Kurva Baku

Pada penelitian ini terdapat 5 seri larutan standart yang berbeda konsentrasi, antara lain 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm. Berdasarkan konsentrasi yang telah disebutkan, diperoleh hasil regresi linier yang dapat dilihat dalam gambar 5.5:



Gambar 5.5 Kurva Baku Kafein

3) Hasil Penetapan Kadar Alkaloid Total

Pada penelitian diperoleh hasil nilai kadar alkaloid total yang terdapat pada ekstrak etanol biji kopi arabika. Berdasarkan pada perhitungan tersebut, dapat dilihat pada tabel 5.4 sebagai berikut :

Tabel 5.4 Hasil Perhitungan Kadar Alkaloid Total

Konsentrasi	Absorbansi	X	Kadar Alkaloid Total	Rata-rata % kadar alkaloid	SD	RSD
Rep 1	0,02358	1926,7 ng	7,7%	8,56%	0,003	3,48%
Rep 2	0,02412	2106,7 ng	8,4%			
Rep 3	0,02499	2396,7 ng	9,6%			

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Ekstraksi Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

Determinasi tanaman pada biji kopi arabika merupakan langkah awal sebelum menuju langkah selanjutnya dalam proses penelitian. Determinasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran tentang tanaman yang akan diteliti dari suku dan jenis tanaman tersebut dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari dari kemungkinan tercampurnya tanaman yang akan diteliti dengan tanaman lain. Hasil determinasi biji kopi arabika (*Coffea arabica*) yang dilakukan di Politeknik Negeri Jember menyatakan bahwa benar tanaman yang akan digunakan untuk penelitian merupakan bagian dari biji kopi arabika (*Coffea arabica*). Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 2.

Sampel biji kopi arabika diperoleh dari Puslitkoka Renteng, Gebang, Nogosari, Kec. Rambipuji, Kabupaten Jember, Jawa Timur. Serbuk biji kopi arabika sebanyak 100 gram dilakukan ekstraksi dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 1L dengan metode maserasi selama 3 x 24 jam (Yulia Senja dkk., 2014). Maserasi merupakan metode ekstraksi sederhana dengan dilakukan perendaman terhadap simplisia dengan melakukan pengadukan berkala (Klau dkk., 2021).

Ekstraksi zat aktif ini melibatkan perendaman bahan baku (simplisia) dalam pelarut yang sesuai pada suhu ruangan, dan dilakukan di bawah perlindungan dari paparan sinar matahari langsung. Interaksi antara zat aktif

dan pelarut mengakibatkan pelarutan zat aktif yang larut dalam pelarut. Pelarut yang ada di dalam sel akan mengandung zat aktif, sementara pelarut yang berada di luar sel belum terisi zat aktif. Ini menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan antara konsentrasi zat aktif di dalam sel dan konsentrasi zat aktif di luar sel. (Marjoni, 2022).

Perbedaan konsentrasi ini akan menyebabkan proses difusi terjadi. Peristiwa ini akan terjadi berulang-ulang sampai didapat kesetimbangan konsentrasi. Untuk mengatasi hal itu terjadi, maka dilakukan remaserasi atau maserasi kembali yang bertujuan optimalisasi proses penyarian zat aktif yang terkandung dalam simplisia. Dalam penelitian ini dilakukan penggantian pelarut selama 1 kali selama 24 jam agar mendapatkan zat aktif yang diinginkan secara keseluruhan. (Klau dkk., 2021).

Ekstrak kental biji kopi arabika diperoleh sebanyak 10,84gram dari 100gram serbuk biji kopi arabika. Rendemen yang diperoleh sebesar 10,84%. Rendemen merujuk pada perbandingan antara produk akhir yang dihasilkan dari bahan baku yang digunakan. Rendemen berkaitan erat dengan metode ekstraksi dan jenis pelarut yang digunakan untuk memisahkan senyawa kimia. Rendemen ekstrak dihitung dengan membagi berat akhir (berat ekstrak yang terbentuk) dengan berat awal yang digunakan, kemudian hasilnya dikalikan 100% (Sari dkk., 2021).

Satu jenis pelarut memiliki potensi untuk menghasilkan perbedaan dalam rendemen yang diperoleh. Pelarut seperti etanol cenderung dapat mengekstraksi senyawa kimia dalam jumlah lebih besar dibandingkan air dan

metanol (Azizah dan Salamah, 2013). Senyawa yang bersifat polar cenderung larut dalam pelarut polar, sementara senyawa yang bersifat nonpolar cenderung larut dalam pelarut nonpolar. Selain pelarut ukuran sampel dapat mempengaruhi sampel. Semakin halus bahan yang digunakan semakin tinggi randemen yang diperoleh (Sineke dkk, 2016).

6.1 Uji Alkaloid

Uji alkaloid menggunakan tiga 3 pereaksi, yaitu mayer, bouchardat, dan dragendorff. Langkah awal sampel diambil 0,5 gr ditambah 9 mL akuades, dipanaskan diatas penangas air selama kurang lebih 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring lalu ditambah asam klorida 2N sekitar 1mL. Filtrat digunakan untuk menguji kandungan alkaloid. Tiga tabung reaksi diambil, kemudian di setiap tabung reaksi dimasukkan 0,5 mL filtrat. Pada setiap tabung reaksi ditetesi reagen sebanyak dua tetes, lalu dapat diamati hasilnya.

Pada penelitian ini uji alkaloid menggunakan 3 pereaksi yaitu mayer, dragendroff, dan bauchardat. Reagen mayer dapat dibuat dengan cara mencampurkan 5 gram kalium iodida ke dalam 10 ml aquadest, kemudian menambahkan larutan 1,36 gram merkuri (II) klorida dalam 60 ml air suling. Setelah itu, campuran tersebut dikocok dan dilanjutkan dengan penambahan aquadest hingga mencapai volume 100 ml. Reagen dragendroft dibuat dengan menimbangkan 8 gr bismuth nitrat dilarutkan dalam 20 ml HNO₃ kemudian dicampur dengan larutan iodide sejumlah 27,2 gr dalam 50 ml air suling.

Campuran tersebut dibiarkan untuk memisahkan dengan sempurna,

kemudian diambil bagian larutan yang jernih dan diencerkan dengan penambahan air hingga mencapai volume 100 ml. Reagen bauchardat dibuat dengan menimbang 4 gr kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml aquadest, lalu ditambahkan 2 gram iodium sambil diaduk hingga larut. Selanjutnya, dilakukan penambahan aquadest hingga mencapai volume 100 ml (Marjoni, 2016)

Hasil dari menggunakan 3 pereaksi tersebut ekstrak etanol biji kopi arabika dinyatakan positif mengandung alkaloid. Positif alkaloid dengan menggunakan pereaksi mayer ditandai dengan terdapat endapan putih reaksi ini terjadi karena senyawa alkaloid berinteraksi dengan ion tetraiodomercurate (II), menghasilkan pembentukan senyawa kompleks yang mengendap. Fenomena ini terjadi karena ion merkuri, yang termasuk dalam kategori ion logam berat, mampu mengendapkan senyawa alkaloid yang memiliki sifat basa (Sulistyarini dkk., 2019).

Positif alkaloid dengan menggunakan pereaksi dragendroff ditandai dengan terdapat endapan jingga muda kekuningan reaksi ini terjadi karena senyawa alkaloid berinteraksi dengan ion tetraiodobismutat (III). Positif alkaloid dengan menggunakan pereaksi bauchardat ditandai dengan endapan kecoklatan, terbentuknya endapan coklat dikarenakan adanya ikatan kovalen antara ion logam K^+ dengan senyawa alkaloid, ini menghasilkan pembentukan kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Sulistyarini dkk., 2019).

6.2 Penetapan Kadar Alkaloid Total

6.2.1 Optimasi Penentuan Fase Gerak

Tujuan dari optimasi fase gerak ini agar diperoleh eluen yang baik agar memperoleh hasil pemisahan yang maksimal. Hasil yang diperoleh dari optimasi fase gerak yaitu etil asetat : metanol (8:2) v/v. Pemisahan 5 seri standar dan 3 replikasi sampel dilakukan dengan menjaga agar tidak melebihi batas atas dan juga menjaga agar tidak terlalu mendekati batas bawah (titik awal penerapan). Perbandingan komposisi dari fase gerak yang digunakan sangat mempengaruhi hasil pemisahan. Standar kafein memiliki sifat polar dan sampel ekstrak etanol biji kopi arabika yang juga bersifat polar. Sifat polar ini menyebabkan interaksi yang lebih kuat dengan fase gerak yang bersifat polar, sehingga komposisi eluen yang dipilih biasanya berupa campuran polar dan semipolar.

Pada optimasi fase gerak yang pertama menggunakan kloroform:metanol (96:4) didapatkan hasil bercak noda pemisahan hanya pada sampel nodanya dekat dengan batas bawah penotolan untuk standart tidak didapatkan bercak noda. Optimasi yang kedua menggunakan kloroform:metanol (9:1) didapatkan dua bercak noda dari sampel dan standart akan tetapi tidak setara noda pada standart lebih mendekati batas atas, sedangkan untuk bercak noda sampel berada ditengah sehingga rentang retardasinya tidak berdekatan. Pada optimasi ketiga dengan menggunakan etil asetat:metanol (8:2) didapatkan bercak noda pemisahan antara sampel dan standart yang baik dapat memisah dengan baik dari batas

bawah hingga pertengahan lempeng.

Untuk pemilihan fase diam berupa silika gel F₂₅₄ 60 karena pengaruhnya paling kecil dalam migrasi hal ini juga mempengaruhi pemilihan fase gerak. Untuk mengoptimalkan fase gerak, penting untuk mempertimbangkan sifat fisiko-kimia analit yang dianalisis dan juga bahan penyerap yang digunakan sebagai fasediam. Pada fase diam dengan prinsip pemisahan berdasarkan polaritas, penting untuk mempertimbangkan nilai koefisien partisi (Log P) dan tetapan disosiasi (pKa) analit dalam menentukan komposisi eluen yang cocok. (Wulandari, 2011).

Permukaan silika gel, yang memiliki gugus Si-O-Si dan Si-OH (silanol), berinteraksi melalui ikatan hidrogen dengan analit dan air. Agar terhindar dari deaktivasi, silika gel perlu dipanaskan pada 110°C selama 30 menit sebelum penggunaan. (Ediningtyas, 2021).

Pada penelitian ini dihasilkan optimasi fase gerak yang sesuai dengan standart kafein dan ekstrak etanol kopi arabika yaitu etil asetat : metanol (8:2) v/v. Hal ini dikarenakan fase gerak yang digunakan dapat memisah dengan baik dan seksama dari batas bawah awal penotollan hingga pertengahan lempeng dan tidak terlalu dekat dengan batas atas. Pemisahan antara standart dan sampel dianalisis dapat memisah dengan baik. Perbandingan komposisi pada fase gerak sangat mempengaruhi hasil dari pemisahan. Pemilihan fase gerak yang efektif menghasilkan kondisi yang baik dan sesuai, karena komposisi dalam fase gerak berimbang sehingga eluasi dapat memisah dengan baik antara standart dan sampel pada lempeng

kromatografi lapis tipis (Wulandari, 2011).

6.2.2 Optimasi Panjang Gelombang

Hasil optimalisasi panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 275 nm, berada dalam rentang 200nm - 400nm. Hasil ini telah memuaskan karena menunjukkan puncak yang terlihat jelas dalam analisis panjang gelombang. Tujuan dari optimalisasi ini adalah untuk mencapai sensitivitas yang tinggi pada sampel. Proses optimalisasi panjang gelombang melibatkan detektor deuterium, yang merupakan spektral UV dengan fluoresensi dalam rentang spektrum 190 nm - 400 nm. Oleh karena itu, rentang yang digunakan selama optimalisasi adalah 200 nm - 400 nm (Wulandari, 2011). Analisis kandungan alkaloid dalam ekstrak etanol biji kopi arabika mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi menunjukkan serapan yang kuat pada daerah spektrum hingga terjadi pergeseran panjang gelombang.

Optimasi panjang gelombang ini dilakukan dengan memerhatikan adanya sistem karbonil yang terkonjugasi dengan dengan cincin aromatik pada senyawa alkaloid. Senyawa alkaloid dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu diultraviolet. Panjang gelombang mempengaruhi hasil dari analisis karena panjang gelombang maksimum memiliki sensitivitas optimal (Ihsan dkk., 2019). Hasil scanning menunjukkan panjang gelombang maksimum sebesar 275 nm. Optimasi panjang gelombang ini dianggap berhasil karena pergeseran spektrum pada daerah tersebut menunjukkan serapan yang kuat dan puncak panjang

gelombang tampak jelas. Berdasarkan rentang panjang gelombang, ekstrak etanol biji kopi arabika diidentifikasi positif mengandung senyawa alkaloid.

Optimasi panjang gelombang ini dilakukan dengan memerhatikan adanya sistem karbonil yang terkonjugasi dengan dengan cincin aromatik pada senyawa alkaloid. Senyawa alkaloid dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu diultraviolet. Panjang gelombang mempengaruhi hasil dari analisis karena panjang gelombang maksimum memiliki sensitivitas optimal (Ihsan dkk., 2019).

Hasil scanning menunjukkan panjang gelombang maksimum sebesar 275 nm. Optimasi panjang gelombang ini dianggap berhasil karena pergeseran spektrum pada daerah tersebut menunjukkan serapan yang kuat dan puncak panjang gelombang tampak jelas. Berdasarkan rentang panjang gelombang, ekstrak etanol biji kopi arabika diidentifikasi positif mengandung senyawa alkaloid.

6.2.3 Optimasi Konsentrasi

Tujuan dari optimasi konsentrasi adalah untuk memperoleh hasil yang menunjukkan perkiraan kandungan kafein dan ekstrak etanol dari biji kopi arabika dalam skala rendah. Hasil dari optimasi konsentrasi mencakup lima seri standar dengan konsentrasi 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm, serta tiga kali replikasi konsentrasi sampel sebesar 5000 ppm. Kualitas konsentrasi uji yang baik diukur berdasarkan parameter konsentrasi dengan nilai N terbesar. Semakin besar nilai N, maka pemisahan yang terjadi juga semakin optimal.

Hasil optimalisasi konsentrasi terdiri dari lima seri standar kafein dengan konsentrasi masing-masing 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm. Untuk konsentrasi sampel ekstrak etanol biji kopi arabika dengan konsentrasi 5000 ppm dengan dilakukan tiga kali replikasi (pengulangan).

Hasil ini cocok karena dalam rentang konsentrasi tersebut, tidak terjadi pencampuran dan bercak pada plat terlihat dengan jelas. Penentuan konsentrasi optimal berdasarkan dengan nilai signifikansi. Konsentrasi optimum standart digunakan untuk membuat kurva baku regresi linier dengan luas area.

6.2.4 Penetapan Kadar Alkaloid Total

Penetapan kadar ini bertujuan untuk mengetahui kadar senyawa alkaloid total yang terdapat pada ekstrak etanol biji kopi arabika dengan menggunakan metode KLT-Densitometri. Persamaan regresi yang diperoleh pada penelitian ini adalah $0,000003x + 0,0178$ pada perhitungan regresi linier diperoleh 0,9952. Hasil % kadar alkaloid total yang diperoleh sebesar 8,56%. Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Latunra dkk (2021) dengan menggunakan instrument spektrofotometer uv-vis yaitu dalam 1 gr kopi arabika terdapat kadar alkaloid sebesar 1,201%. Perbedaan ini terjadi karna penggunaan konsentrasi standart dan sampel serta instrument yang berbeda.

Faktor lain dari sampel yang menjadi penyebab terjadinya perbedaan

kadar tinggi. Adapun beberapa faktor yang mempengaruhi perbedaan kadar alkaloid yaitu dipengaruhi oleh kondisi tanah, waktu panen, gen kopi, ketinggian tempat tumbuh, waktu sangria, tingkat kematangan (Supriadi dkk., 2016). Kondisi tanah dan daerah tumbuh sangat mempengaruhi kandungan kimia yang dihasilkan oleh suatu tumbuhan karena pada tanah banyak mengandung unsur hara yang sangat penting untuk proses pembentukan senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan (Mahara dkk., 2022).

Hasil dari penetapan kadar alkaloid total yang diperoleh dari ekstrak etanol biji kopi arabika sebesar 8,56% dalam 25 mg ekstrak etanol biji kopi arabika. Hasil nilai regresi yang diperoleh dari persamaan baku memenuhi syarat yaitu 0,9952 mendekati 1 (Gita dkk., 2021) Hasil perhitungan deviasi standar (SD) dari tiga pengulangan data sampel ekstrak etanol biji kopi arabika adalah 0,003. Sedangkan nilai deviasi standar relatif (RSD) yang ditemukan adalah 3,48%. Kondisi ini dianggap memenuhi kriteria, karena presisi ulangan yang baik biasanya memiliki nilai $RSD \leq 5\%$. (Asis dkk., 2020).

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

- 1) Pada penelitian ini didapatkan ekstrak kental dari proses maserasi ekstrak etanol biji kopi arabika (*Coffea arabica*) dan diperoleh % randemen sebesar 10,84%
- 2) Pada uji alkaloid sampel biji kopi arabika (*Coffea arabica*) dinyatakan positif mengandung alkaloid. Dengan menggunakan reagen mayer positif alkaloid dengan terbentuknya endapan putih kekuningan, menggunakan reagen dragendroff terbentuknya endapan berwarna jingga, menggunakan bauchardat terbentuknya endapan berwarna coklat.
- 3) Pada penelitian ini didapatkan % kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kopi arabika setiap 100 mg sebesar 8,56% dengan nilai SD 0,003. Pada optimasi fase gerak diperoleh etil asetat : metanol (8x2) v/v. Untuk optimasi panjang gelombang diperoleh 275 nm. Optimasi konsentrasi standart ada 5 seri yaitu 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm. Untuk nilai Rf yang diperoleh dinyatakan dapat memenuhi syarat masuk dalam rentang 0,2-0,8.

7.2 Saran

- 1) Peneliti selanjutnya diharapkan bisa menjadikan penelitian ini menjadi sumber informasi tentang analisis dan penetapan kadar alkaloid total pada ekstrak etanol biji kopi arabika (*Coffea arabica*) dengan metode

KLT-Densitometri.

- 2) Bagi masyarakat diharapkan dapat memberikan informasi kadar alkaloid total yang terkandung dalam biji kopi arabika (*Coffea arabica*).
- 3) Peneliti selanjutnya diharapkan dapat dilakukan penelitian penetapan kadar alkaloid dengan menggunakan metode yang berbeda selain KLT- Densitometri.
- 4) Perlu dilakukan penelitian analisis dan penetapan kadar alkaloid menggunakan sampel tanaman kopi arabika (*Coffea arabica*) seperti bagian akar, daun, tangkai.
- 5) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa lain yang terkandung dalam ekstrak etanol biji kopi arabika (*Coffea arabica*).

DAFTAR PUSTAKA

- Ajhar, N.M. dan Meilani, D. 2020. Dari Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) *Phytochemicals Screening And Antioxidant Activity From Arabica Coffee (Coffea arabica) Ethanol Extract Which Grow In Gayo Area With Dpph Method, Pharma explore*, 5(1):34–40.
- Alzanado, R., Yusuf, M., Tutik. 2022. Analisis Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Daun Bunga Pepaya (*Carica papaya* L.) Secara Spektrofotometri Uv-Vis, *Farmasi Malahayari*, 5(1). 108–120.
- Anshori, M.F. 2014 Analisis Keragaman Morfologi Koleksi Tanaman Kopi Arabika dan Robusta
- Asiah, N. 2022. Profil Kopi Arabika Kintamani Bali. 1th. Edition Kepajen
- Malang Asis, M.A., Purnawansyah, P. and Manga, A.R. 2020. Penerapan System Development Life Cycle pada Sistem Validasi Metode Analisis Sediaan Farmasi, *Buletin Sistem Informasi dan Teknologi Islam*, 1(3). 145–149.
- Budiman, H., Rahmawati, F. and Sanjaya, F. 2014. 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), 54–64.
- Chairunnisa, S., Wartini, N.M. dan Suhendra, L. 2019. Pengaruh Suhu dan Waktu Maserasi terhadap Karakteristik Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana* L.) sebagai Sumber Saponin, *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 7(4), 551.
- Cipac, 2003. (*Collaborative International Pesticides Analytical Council CIPAC*). *Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations*.
- Coffeefag, 2001. *Frequently Asked Questions about Caffeine*, *Jurnal Ilmiah Farmasi* 2(4), 123.
- Danasrayaningsih, V.S. 2015 Penetapan Kadar Kafein Dalam Minuman Berenergi Merek “X” Dengan Metode Spektrofotometri Derivatif Aplikasi Peak-To-Peak, *Universitas Sanata Dharma*, (3). 4–5.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia 1979. *Farmakope Indonesia*. 3th Edition. Jakarta: Depkes RI, 1979.
- Departemen Kesehatan RI 2013. *Penentuan Kadar Alkaloid*.
- Dio, R.G.R., Kiswandono, A.A., dan Supriyanto, R. 2021 Validasi Metode Fotodegradasi Congo Red Terkatalis ZnO/Zeolit Y Secara

- Spektrofotometri Uv-Vis, *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 6(02). 134–144.
- Edowai, D.N. (2019) Analisis Sifat Kimia Kopi Arabika (*Coffea arabica L*) Asal Dogiyai, *Agriteknologi*, 2(1), 16.
- Fajriana, N.H. dan Fajriati 2018. Analisis Kadar Kafein Kopi Arabika (*Coffea Arabica L.*) Pada Variasi Temperatur Sangrai Secara Spektrofotometri Ultra Violet, *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 3(02). 148–162.
- Fatimah, S.F., Edityaningrum, C.A., Istiqomah, W.N., Gandjar, I.G., dan Nurani, L.H., 2020 Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis (Klt)-Densitometri Untuk Penetapan Kadar B-Karoten Dalam Tablet Kunyah Ekstrak Spirulina Platensis, *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina (JIIS): Ilmu Farmasi dan Kesehatan*, 5(1). 137–148.
- Fatan, F.A., Qothrunnada, G.R., Elsiana, I., Ulum, K., Kurnia, K.A., Widyatamaka, S.Q., Paujiah, S. 2022. Metode Validasi Analisis Senyawa Kimia Obat Dalam Sampel Biologis (Plasma Darah)
- Fri, M., Y. Buriko, 2022. Analisis Kadar Senyawa Alkaloid Dan Tanin Ekstrak Daun Arogo (*Premna serratifolia*).
- Furqan, M. dan Nurman, S. 2020. Ekstrak Polar Kopi Hijau Arabika (*Coffea arabica L.*) sebagai Antihiperqlikemi pada Mencit (*Mus musculus*), *Journal of Healthcare Technology and Medicine*, 6(2). 1323–1331.
- Hailu, H. 2011 *Growth and Physiological Response of Two Coffea arabica L. Populations under High and Low Irradiance*, *Addis Ababa University*, 2(1). 1–86.
- Hamdani, I. dan Nurman, S. 2020. Ekstrak Etanol Kopi Hijau Arabika (*Coffea arabica L.*) sebagai Antihiperqlikemi pada Mencit (*Mus musculus*), *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 140–147.
- Handoyo, D., L.Yunita, 2020. Pengaruh Lama Waktu Maserasi (Perendaman) Terhadap Kekentalan Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle*), *Jurnal Farmasi Tinctura*, 2(1). 34–41.
- Ihsan, B.R.P., Rahmani, P.A. dan Shalas, A.F. 2019. Validasi Metode KLT-Densitometri untuk Analisis Kuersetin Dalam Ekstrak dan Produk Jamu yang Mengandung Daun Jambu Biji (*Psidium guajava L.*)', *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, 5(1). 45–51.
- Kadek, N. A. Pramesti., Putu, N. V.G. Putri., Ayu, I. M. L. Dewi., Moreira, M. V., dan Antorini, L.R. 2021. Identifikasi dan Penetapan Kadar Kinin Ekstrak Kulit Batang Kina (*Cinchona succirubra*) secara KLT-Densitometri *Identification and Determination of Quinine Stem Bark (Cinchona succirubra) by TLC-Densitometry*, *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 7(2). 118–

128.

- Kapondo, G.L., Fatimawali., dan Jayanti, M. 2020. Isolasi, Identifikasi Senyawa Alkaloid Dan Uji Efektivitas Penghambatan Dari Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*, Jurnal e-Biomedik, 8(2). 180–186.
- Klau, I.C.S., Ningsih, A.W. dan Putra, W.F.I. 2021. Profil Rendemen Ekstrak Dan Fraksi Kulit Buah, Daging Buah Dan Buah Pisang Mentah (*Musa paradisiaca L.*), *Journal of Pharmacy Science and Technology*, 3(1). 181–190.
- Latief, M., Muhaimin, M., Amanda, H., Tarigan, I. L. 2021. *Isolation of alkaloids compound of ethanol extract of mangrove perepat (S. alba) root and its antibacterial activity*, Jurnal Ilmiah Farmasi, 17(1). 9–18.
- Marjoni, M. R. 2016. Dasar-Dasar Fitokimia Untuk Diploma III Farmasi.1th Edition. Jakarta Timur.
- Marjoni, M. R. 2022. Buku Teks Fitokimia Seri Ekstraksi. 1th Edition. Jakarta Timur.
- Milanda, R.D. 2021. Ekstrak Metanol Pada Sampel Teh Hitam Dari PTPN XII Lawang Jawa Timur Menggunakan KLT-Densitometri.
- Muharam, F. dan Sriwidodo 2022. Potensi Kopi Arabika (*Coffea arabica L.*) Dari Berbagai Aktivitas Farmakologi & Bentuk Sediaan Farmasi, Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian, 7(3). 395–406.
- Mukhaimin, I., Latifahnya, A.N., Puspitasari, E. 2018. *Antidengue, Anticancer, Antimicro Bial, Antiparasitic, Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antidiabetic Activities.*, 1(2). 66–73.
- Nugraha, P., Juliansyah, E., Pratama, R. 2022. Faktor-Faktor Yang Berhubungan Kapuas Kanan Hulu Kecamatan Sintang Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Kapuas Raya Sintang *Factors Related To The Event Of Diarrhe In Toddlers In The Kapuas Kanan Hulu Sub-Distr*, Jurnal Kesehatan Masyarakat, Vol.1 No.1 Oktober 2022.1(1).
- Peggy, P.Y. Kosasih., Putri, N.N., Girsang, E. 2021. Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica L.*), Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kesehatan Masyarakat, 6(2). 56–67.
- Sabarni, S. dan Nurhayati, N. 2019. Analisis Kadar Kafein Dalam Minuman Kopi Khop Aceh Dengan Metode Spektroskopik, Lantanida Journal, 6(2). 141.
- Safitri, W.R. 2016. *Pearson correlation analysis in determining the relationship between the incidence of dengue hemorrhagic fever and population density in the city of Surabaya in 2021-2014*, *Journal of Public Health*, 16. 21–29.

- Salamah, N., Rozak, M., Al-Abror, M. 2017. Pengaruh Metode Penyarian Terhadap Kadar Alkaloid Total Daun Jembirit (*Tabernaemontana sphaerocarpa. BL*) Dengan Metode Spektrofotometri Visibe, *Pharmaciana*, 7(1). 113.
- Sari, Y., Syahrul, S. dan Iriani, D. 2021. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan pada Kijing (*Pylsbryoconcha Sp*) dengan Pelarut Berbeda, *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*, 13(1). 16–20.
- Savitri, A., Megantara, S. 2019. Metode KLT-Densitometri Sebagai Penetapan Kadar Bahan Aktif Sediaan Farmasi. *Farmaka Farmaka*, 17.
- Senja, R.Y., Issusilaningtyas, E., Nugroho, A.K., dan Setyowati, E.P. 2014. Perbandingan Metode Ekstraksi Dan Variasi Pelarut Terhadap Rendemen Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kubis Ungu (*Brassica Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra*), *Traditional Medicine Journal*, 19(1). 2014.
- Setyaningrum, L., Purwaningtyas, D., Rosita, A., Wigati, D., Usman, M. R., Latifah, M.S. 2022. *Development and Validation of RP-HPLC Analysis Method for Determination of Total Alkaloid Content of Soursop (Annona muricata L.) Leaf Extract*, Eksakta: Berkala Ilmiah Bidang MIPA, 23(03). 175–187.
- Stanley, A. 2018. Validasi Metode *Thin-Layer Chromatography (TLC)*-Densitometri Pada Penetapan Kadar Kafein Dalam Validasi Metode *Thin-Layer Chromatography (TLC)*-Densitometri Pada Penetapan Kadar
- Sineke, F.U., Suryanto, E. dan Sudewi, S. 2016 Penentuan Kandungan Fenolik Dan Sun Protection Factor (Spf) Dari Ekstrak Etanol Dari Beberapa Tongkol Jagung (*Zea mays L.*), *Pharmacon*, 5(1). 279–280.
- Sulistyarini, I., Sari, D.A. dan Wicaksono, T.A. 2019. Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*), *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*. 56–62.
- Sunnah, I., Dianingati, R.S. dan Wulandari, A.R. 2021. Optimasi Pelarut Terhadap Parameter Spesifik Ekstrak Kitolod (*Isotoma longiflora*), *Generics: Journal of Research in Pharmacy*, 1(1). 10–15.
- Supriadi, H., Randriani, E. dan Towaha, J. 2016. *Correlation Between Altitude, Soil Chemical Properties, and Physical Quality of Arabica Coffee Beans in Highland Areas of Garut*, *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, 3(1).45.
- Verawati, Nofiandi, D. dan Mulyani, S. 2016. Pengaruh Perbedaan Jenis Asam Terhadap Kadar Alkaloid Total Daun Bantotan (*Ageratum conyzoides L.*), *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal*, 1(2). 22–28.

- Vifta, R.L. dan Advistasari, Y.D. 2018 Skrining Fitokimia, Karakterisasi, dan Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Buah Parijoto (*Medinilla speciosa B.*), Prosiding Seminar Nasional Unimus, 1. 8–14.
- Wahyuni, S. dan Marpaung, M.P. 2020. Penentuan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca Miers*) Berdasarkan Perbedaan Konsentrasi Etanol Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis, Dalton : Jurnal Pendidikan Kimia dan Ilmu Kimia, 3(2). 52–61.
- Wardani, A.D. 2021. Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Spektrofotometri Uv-Vis Di Desa Kemiri.
- Wulandari, L. 2011 Kromatografi Lapis Tipis, Taman Kampus Presindo.
- Wusnah, W., Bahri, S., dan Hartono, D. 2019 Proses Pembuatan Bioetanol dari Kulit Pisang Kepok (*Musa acuminata B.C*) secara Fermentasi', Jurnal Teknologi Kimia Unimal, 8(1). 48.
- Yousef, H.M. dan Amina, M. 2018. *Essential Oil Of Coffe Arabica L. Husks: A Brilliant Source Of Antimicrobial And Antioxidant Agents*. Biomedical Research (India), 29 (1) : 174-180.
- Zarwinda, I dan Sartika, D. 2018. Pengaruh Suhu Dan Waktu Ekstraksi Terhadap Kafein Dalam Kopi, Lantanida Journal, Vol. 6 No. 2 103-202

LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal Kegiatan Skripsi

No	Kegiatan	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul	Agt
1.	Penyusunan proposal									
2.	Proses bimbingan									
3.	Seminar proposal									
4.	Revisi									
5.	Pelaksanaan penelitian									
6.	Pengolahan dan penyusunan hasil penelitian									
7.	Sidang hasil penelitian									
8.	Revisi									
9.	Pengumpulan skripsi									

Lampiran 2. Determinasi Tanaman



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>

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 068/PL17.8/PG/2023

Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi Sarjana Farmasi No: 1196/FIKES.UDS/U/III/2023 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPA. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Lilik Nur Fitriani
NIM : 19040072
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 arabica, L

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 03 April 2023
Ka. UPA Pengembangan Pertanian Terpadu

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

Lampiran 3. Dokumentasi Sertifikat Kafein

Sigma-Aldrich

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) 50 mg/mL, CHCl ₃	Clear	Clear
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

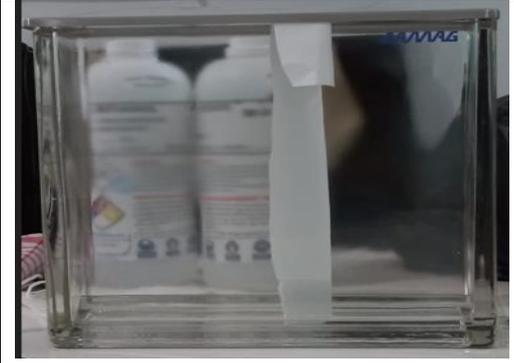
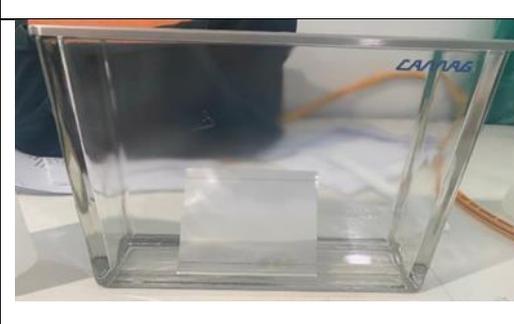
Version Number: 01 Doc: 1084343 Page 1 of 1

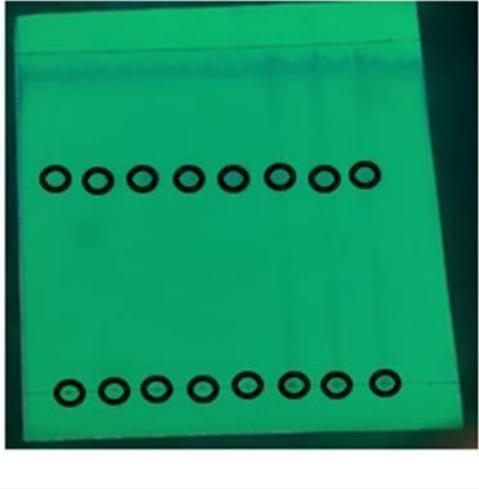
The branding on the header and/or footer of this document may temporarily not visually match the product purchased as we transition our branding. However, all of the information in this document regarding the product remains unchanged and matches the product ordered. For further information please contact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

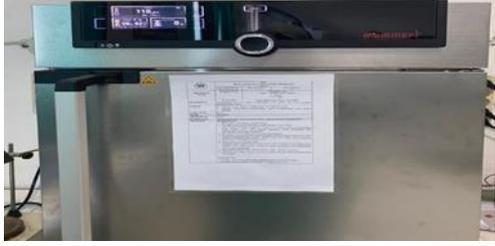


Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

Gambar	Keterangan
	<p>Sampel Biji Kopi Arabika sudah siap pakai</p>
	<p>Proses menimbang sampel</p>
	<p>Proses ekstraksi maserasi selama 3 x 24 jam dilanjutkan dengan remaserasi 1 x 24 jam</p>

	<p>Hasil ekstrak kental setelah proses evaporasi</p>
	<p>Penjenuhan chamber untuk eluasi</p>
	<p>Pembuatan larutan standart dan sampel</p>
	<p>Proses eluasi dengan menggunakan etil asetat : metanol (8:2) v/v</p>

	Hasil penotolan pada lempeng KLT
	Uji Alkaloid dengan menggunakan reagen dragendroff, mayer, bauchardat
	Lampu UV untuk melihat noda penotolan pada lempeng KLT

	<p>Oven untuk mengoven lempeng yg dioptimasi</p>
	<p>Instrumen Densitometri Camag dengan software CATS</p>

Lampiran 5. Tabel Perhitungan Ekstraksi Maserasi

Hasil Ekstrak Kering	Hasil Penimbangan
Berat Serbuk Awal (g)	100
Berat Cup Kosong (g)	3.46
Berat Cup Kosong (g) + Ekstrak kering	14.30
Berat Ekstrak Kering	10.84
% Randemen	10.84%

Lampiran 6. Tabel Nilai Luas Area dan Nilai Rf

Vial ID	Luas Area	Rf
S1	0.02322	0.605
S2	0.02764	0.610
S3	0.03416	0.615
S4	0.03806	0.620
S5	0.04408	0.623
S6	0,02358	0.601
S7	0,02412	0.603
S8	0,02499	0.603

Lampiran 7. Perhitungan Konsentrasi Kurva Baku

- 1) Larutan induk

$$\frac{50 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mg/L} = 2000 \text{ ppm}$$

- 2) Larutan standar

$$\text{Rumus pengenceran} \rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

a) 200 ppm ad 5 mL = 0,5 mL

b) 400 ppm ad 5 mL = 1 mL

c) 600 ppm ad 5 mL = 1,5 mL

d) 800 ppm ad 5 mL = 2 mL

e) 1000 ppm ad 5 mL = 2,5 mL

- 3) Larutan sampel

a) $\frac{25 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mg/L} = 5000 \text{ ppm}$

b) $\frac{25 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mg/L} = 5000 \text{ ppm}$

c) $\frac{25 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mg/L} = 5000 \text{ ppm}$

- 4) Perhitungan persamaan regresi yang didapat

$$a = 0,0178$$

$$b = 0,000003x$$

$$r = 0,9952$$

$$y = 0,000003x + 0,0178$$

Lampiran 8. Perhitungan Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

1) Sampel Replikasi 1

$$y_1 = 0,02358$$

$$y = 0,000003x + 0,0178$$

$$0,02358 = 0,000003x + 0,0178$$

$$X = \frac{0,02358 - 0,0178}{0,000003}$$

$$= 1926,7 \text{ ng}$$

- Konsentrasi alkaloid total dalam volume penotolan 5 μL (0,005 mL)

$$= \frac{1926,7 \text{ ng}}{0,005 \text{ mL}}$$

$$= 385.340 \text{ ng/mL}$$

- Massa alkaloid total dalam volume larutan sampel

$$= 385.340 \text{ ng/mL} \times 5 \text{ mL}$$

$$= 1.926.700 \text{ ng}$$

$$= 1,93 \text{ mg}$$

- Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$$

$$= \frac{1,93 \text{ mg}}{25 \text{ mg}}$$

$$= 0,077 \text{ mg}$$

- % Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{1,93 \text{ ng}}{25 \text{ ng}} \times 100 \%$$

$$= 7,7 \%$$

2) Sampel Replikasi 2

$$y_1 = 0,02412$$

$$y = 0,000003x + 0,0178$$

$$0,02412 = 0,000003x + 0,0178$$

$$x = \frac{0,02412 - 0,0178}{0,000003}$$

$$= 2106,7 \text{ ng}$$

- Konsentrasi alkaloid total dalam volume penotolan 5 μL (0,005 mL)

$$= \frac{2106,7 \text{ ng}}{0,005 \text{ mL}}$$

$$= 421.340 \text{ ng/mL}$$

- Massa alkaloid total dalam volume larutan sampel

$$= 421.340 \text{ ng/mL} \times 5 \text{ mL}$$

$$= 2.106.700 \text{ ng}$$

$$= 2,11 \text{ mg}$$

- Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$$

$$= \frac{2,11 \text{ mg}}{25 \text{ mg}}$$

$$= 0,0844 \text{ mg}$$

- % Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{2,11}{25 \text{ mg}} \times 100 \%$$

$$= 8,4 \%$$

3) Sampel Replikasi 3

$$y_1 = 0,02499$$

$$y = 0,000003x + 0,0178$$

$$0,02499 = 0,000003x + 0,0178$$

$$x = \frac{0,02499 - 0,0178}{0,000003}$$

$$= 2396,7 \text{ ng}$$

- Konsentrasi alkaloid total dalam volume penotolan 5 μL (0,005 mL)

$$= \frac{2396,7 \text{ ng}}{0,005 \text{ mL}}$$

$$= 479.340 \text{ ng/mL}$$

- Massa alkaloid total dalam volume larutan sampel

$$= 479.340 \text{ ng/mL} \times 5 \text{ mL}$$

$$= 2.396.700 \text{ ng}$$

$$= 2,4 \text{ mg}$$

- Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}}$$

$$= \frac{2,4 \text{ mg}}{25 \text{ mg}}$$

$$= 0,096 \text{ mg}$$

- % Kadar alkaloid total

$$= \frac{\text{Massa alkaloid total dalam ekstrak}}{\text{Massa sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{2,4}{25} \times 100 \%$$

$$= 9,6 \%$$

$$\text{➤ Rata-rata kadar alkaloid total} = \frac{0,096 \text{ mg} + 0,077 \text{ mg} + 0,0844 \text{ mg}}{3}$$

$$= 0,086 \text{ mg}$$

$$\text{➤ Rata-rata \% kadar alkaloid total} = \frac{7,7\% + 8,4\% + 9,6\%}{3}$$

$$= 8,56\%$$

$$\begin{aligned}SD &= \sqrt{\frac{(0,077-0,086)^2 + (0,0844-0,086)^2 + (0,096-0,086)^2}{3-1}} \\&= \sqrt{\frac{0,0001 + 0,00008 + 0,000003}{2}} \\&= \sqrt{\frac{0,000183}{2}} \\&= \sqrt{0,00009} \\&= 0,003 \\RSD &= \frac{0,003}{0,086} \times 100 \% \\&= 3,48 \%\end{aligned}$$

Lampiran 9. Output Instrument Densitometri

Analysis: Lilik Nur Fitriani_9_20230516_142206

Path: Home/UDS

Based on method: Lilik Nur Fitriani_9

Created	16-May-2023 14:22:09	visionCATSuser
Modified	16-May-2023 14:44:43	visionCATSuser
Last HPTLC log	16-May-2023 14:44:43	Analysis modified
Explorer notes		

Track	Vial ID	Description	Volume	Position	Type
1	S1	STD 1	5.0 µl	N/A	Reference
2	S2	STD 2	5.0 µl	N/A	Reference
3	S3	STD 3	5.0 µl	N/A	Reference
4	S4	STD 4	5.0 µl	N/A	Reference
5	S5	STD 5	5.0 µl	N/A	Reference
6	S6	REP 1	5.0 µl	N/A	Sample
7	S7	REP 2	5.0 µl	N/A	Sample
8	S8	REP 3	5.0 µl	N/A	Sample
9					

Track Assignment notes

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

System setup:

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

Chromatography

Plate layout:

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

Application 1 - Manual application:

Notes	
-------	--

Development 1 - Chamber:

Tank	
Mobile phase	Etil Asetat : Metanol 8 : 2 (v/v)
Saturation time	20 min
Use saturation pad	true
Use smartALERT	false
Volume front through	0 ml
Volume rear through	0 ml
Drying time	5 min
Drying temperature	Room temperature
Notes	

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

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

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

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

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

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

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

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

Substance kafein (R_F 0.597 +/- 0.293):

Track	R_F	X (mm)	Y (mm)
1	0.605	10.0	58.4
2	0.610	18.0	58.8
3	0.615	26.0	59.2
4	0.620	34.0	59.6
5	0.623	42.0	59.8
6	0.601	50.0	58.1
7	0.603	58.0	58.2
8	0.603	66.0	58.2

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

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

System suitability tests:

SST settings:

SST tracks	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
------------	------------------------

Substance kafein 5

Substance name	kafein 5
R_F	0.623
ΔR_F	0.010
Step	
Λ	
Status	Not computed
Description	

Substance kafein 4

Substance name	kafein 4
R_F	0.620
ΔR_F	0.010
Step	
Λ	
Status	Not computed
Description	

Substance kafein 3

Substance name	kafein 3
R_F	0.615
ΔR_F	0.010
Step	
Λ	
Status	Not computed
Description	

Substance kafein 2

Substance name	
R_F	0.610
ΔR_F	0.010
Step	
Λ	
Status	Not computed
Description	

Substance kafein 1	
Substance name	kafein 1
R_F	0.605
ΔR_F	0.010
Step	
Λ	
Status	Not computed
Description	

Substance Arabika 2	
Substance name	Arabika 2
R_F	0.603
ΔR_F	0.010
Step	
Λ	
Status	Not computed
Description	

Substance Arabika 3	
Substance name	Arabika 3
R_F	0.603
ΔR_F	0.010
Step	
Λ	
Status	Not computed
Description	

Substance Arabika 1	
Substance name	Arabika 1
R_F	0.601
ΔR_F	0.010
Step	
Λ	
Status	Not computed
Description	

Data acquisition

Application 1 - Manual application:

Executed 16-May-2023 14:23:30 visionCATSuser

Development 1 - Chamber:

Executed 16-May-2023 14:23:33 visionCATSuser

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

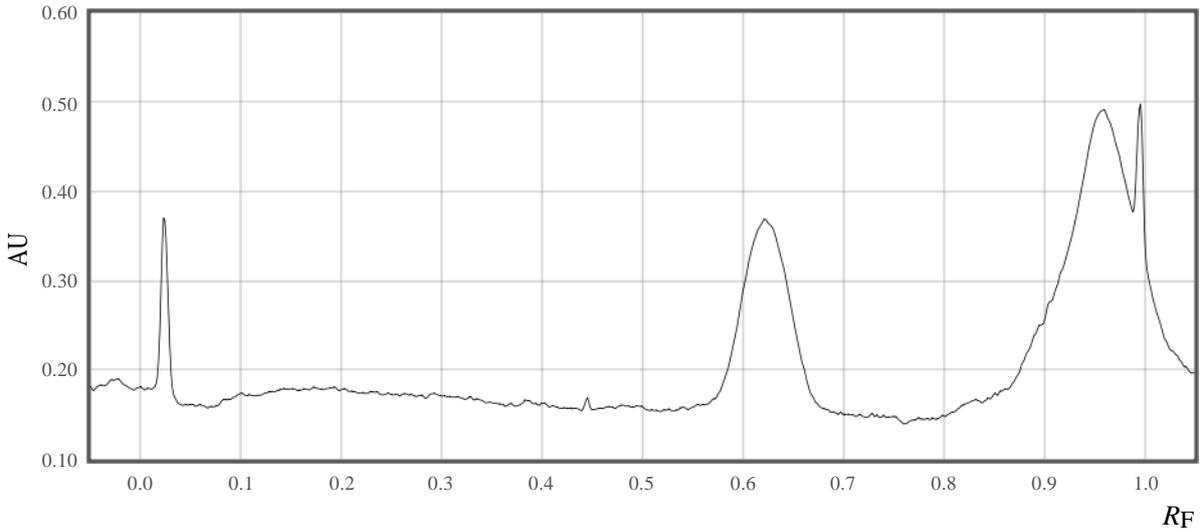
Executed 16-May-2023 14:23:35 visionCATSuser

Scan:

Wavelength 254 nm

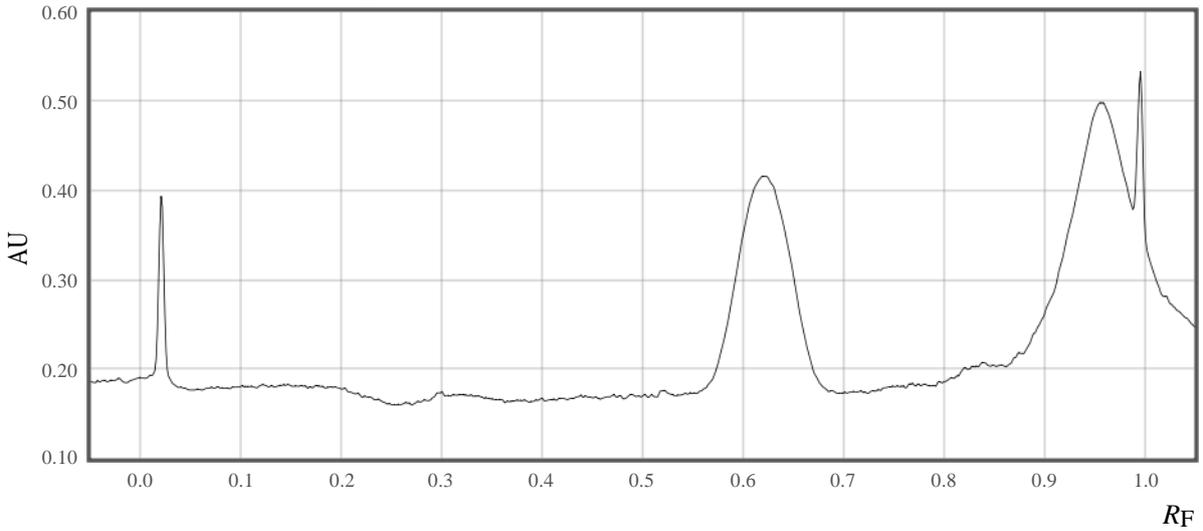
Track 1:

Type Single λ



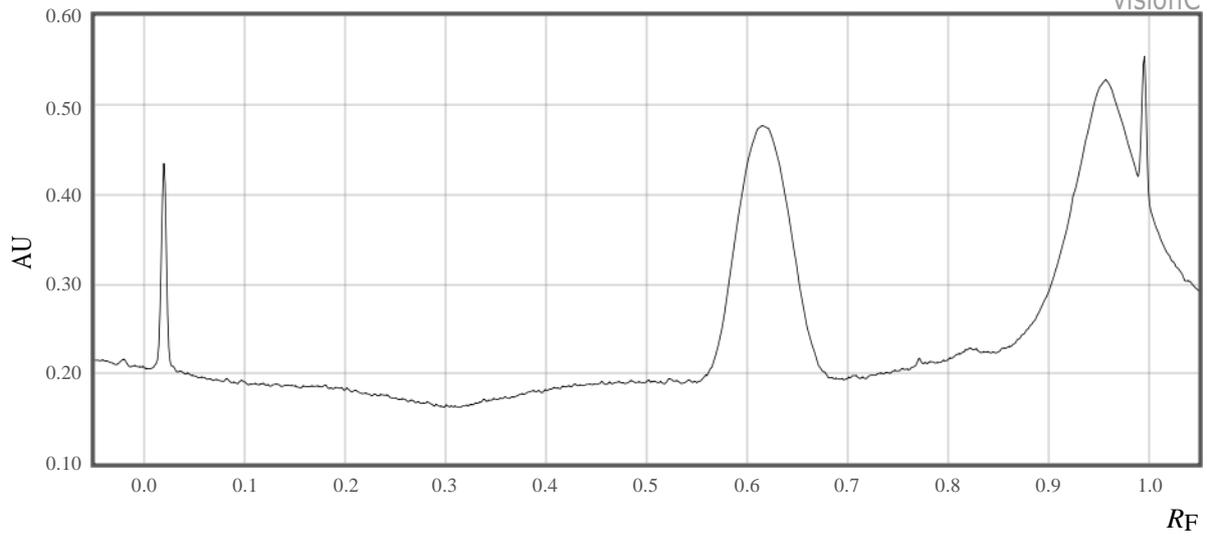
Track 2:

Type Single λ



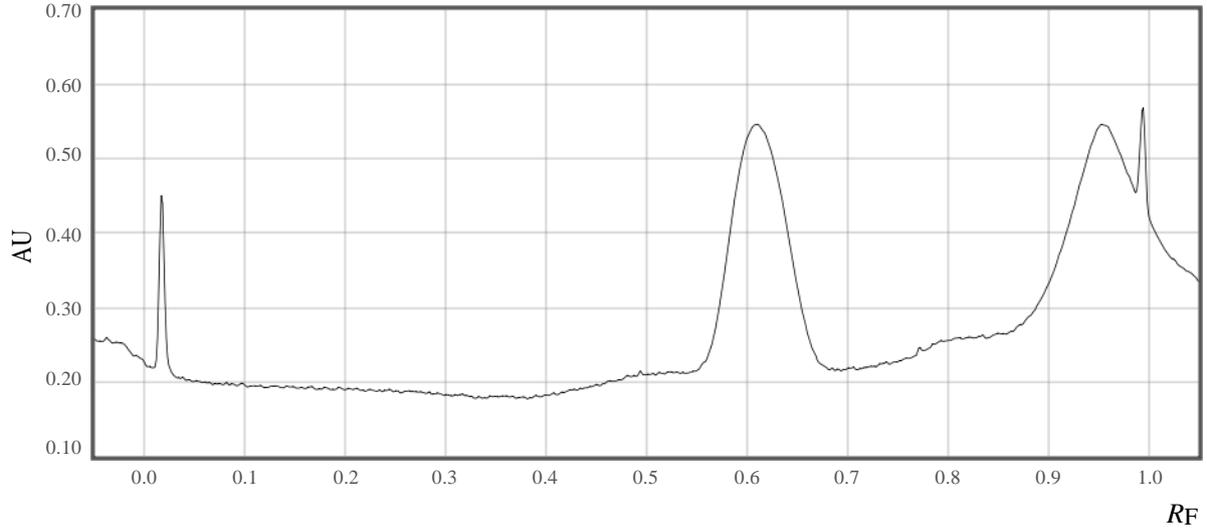
Track 3:

Type Single λ



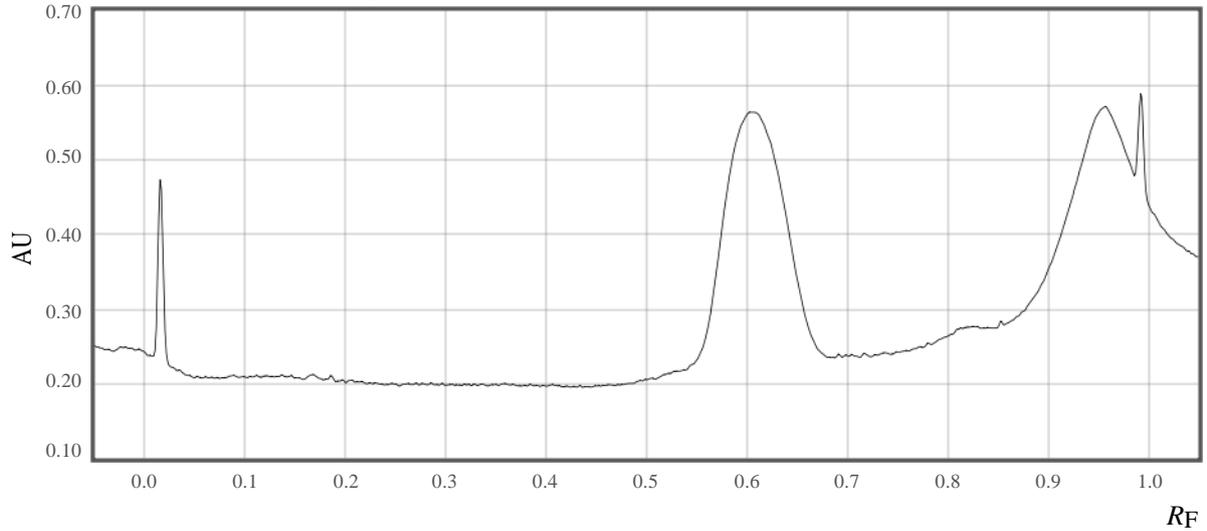
Track 4:

Type Single λ



Track 5:

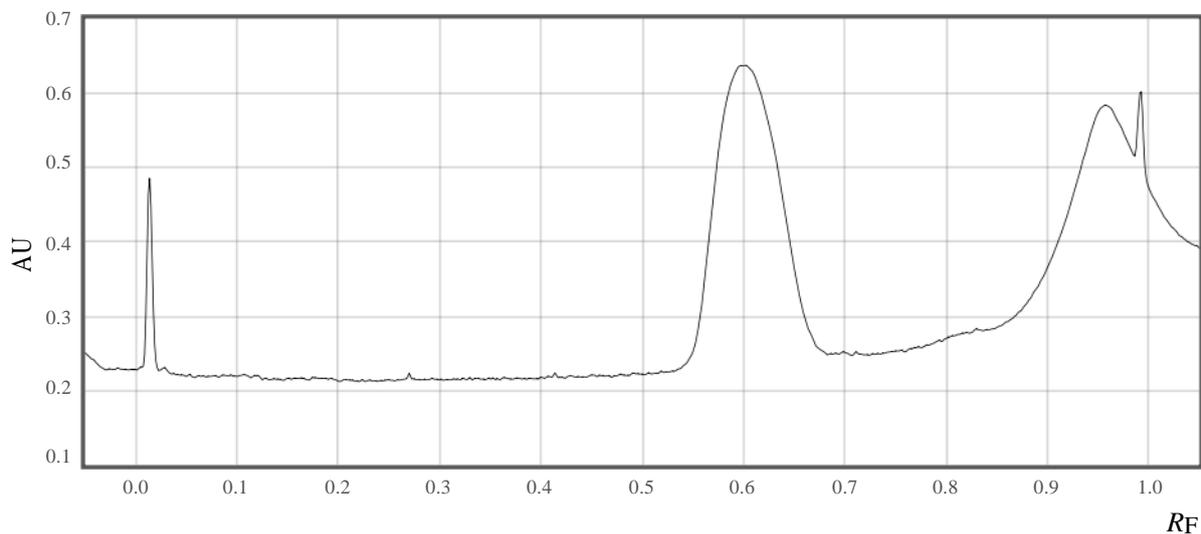
Type Single λ



Track 6:

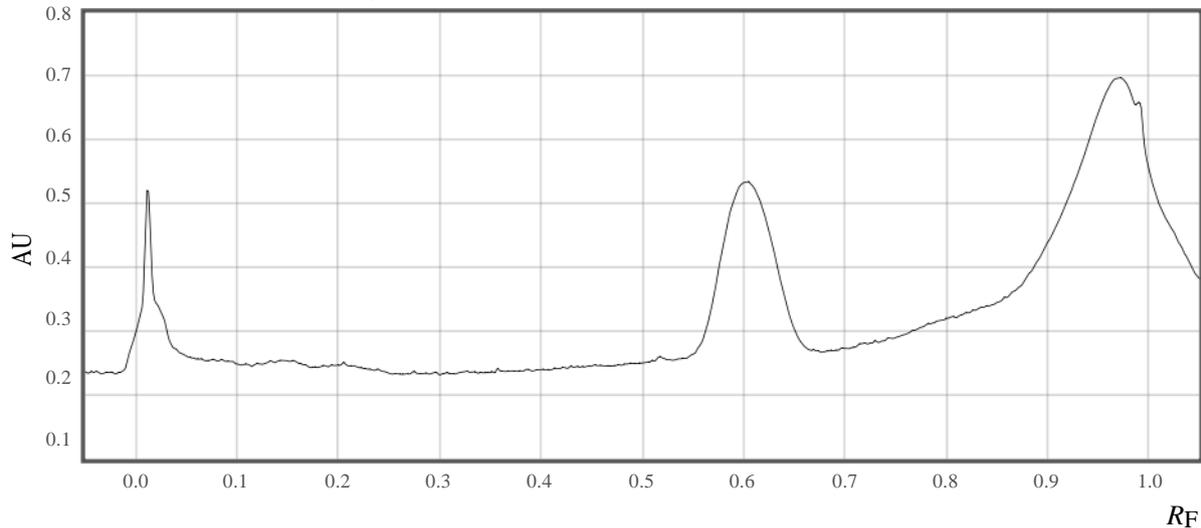
visionC

Type Single λ



Track 7:

Type Single λ

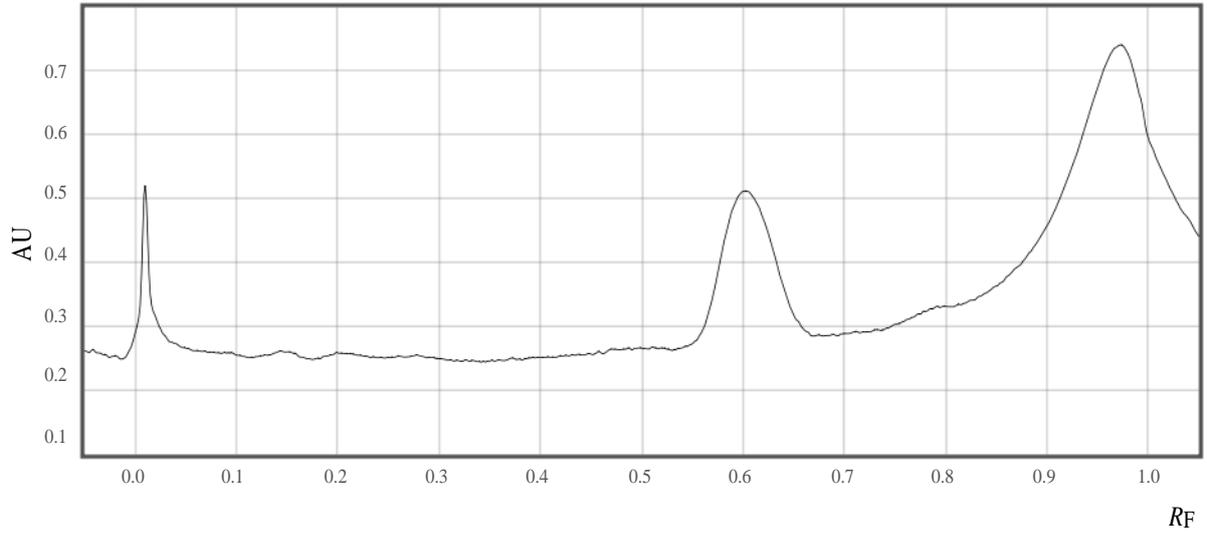


Track 8:

Type Single λ

Lilik Nur

visionC

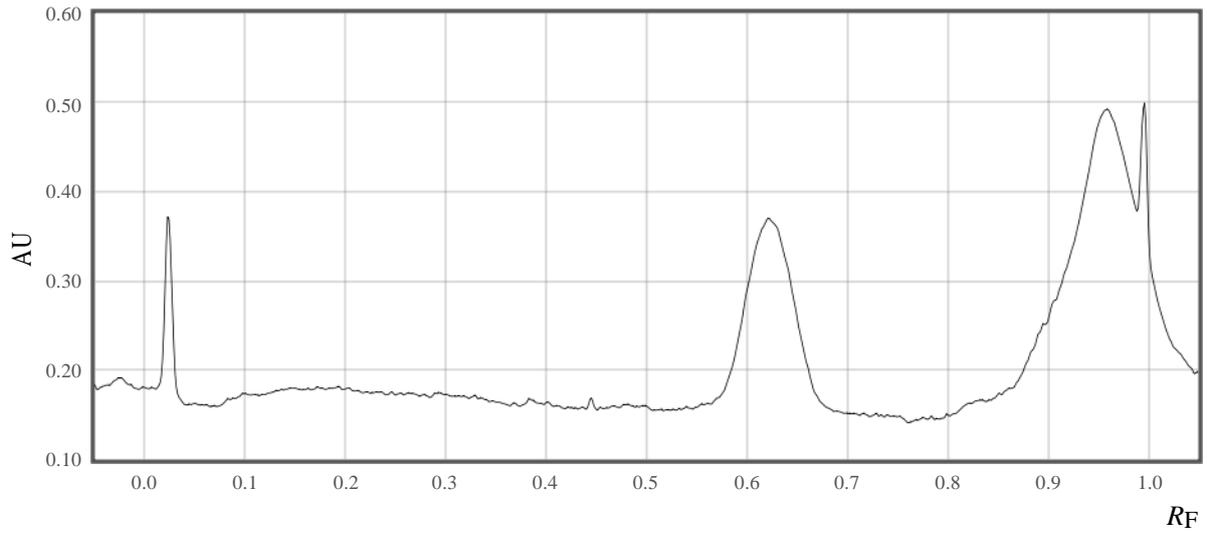


Scan developed plate 1b - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):

Executed 16-May-2023 14:25:51 visionCATSuser

Scan:

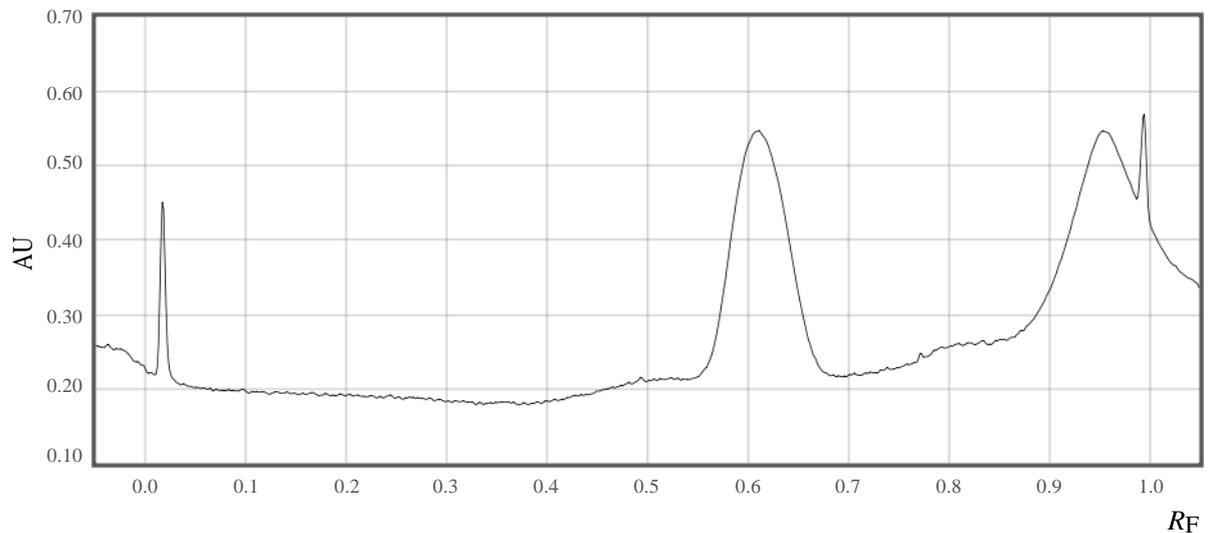
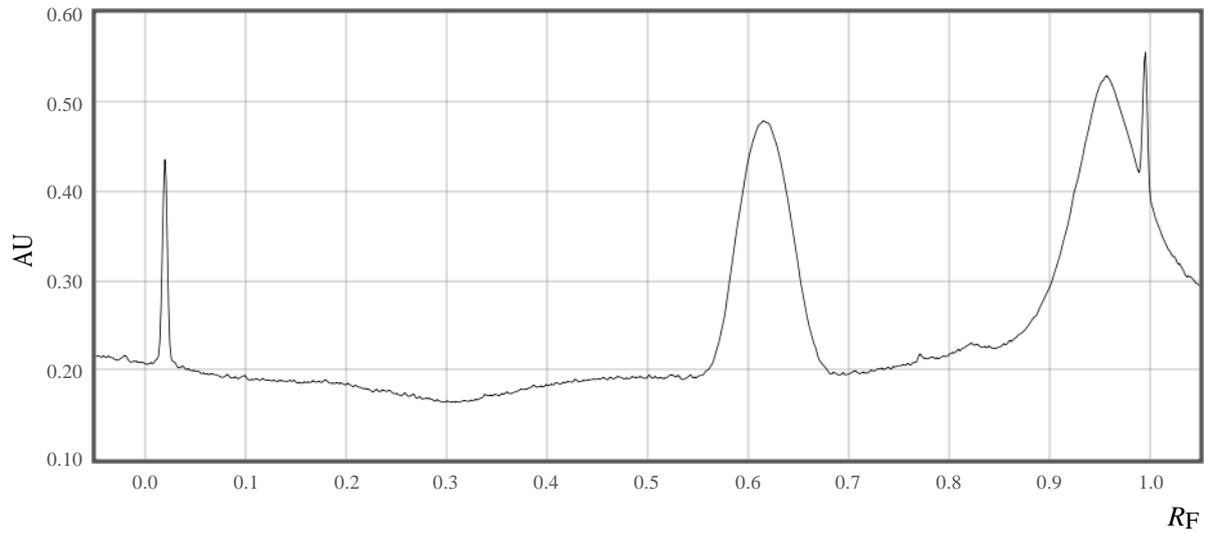
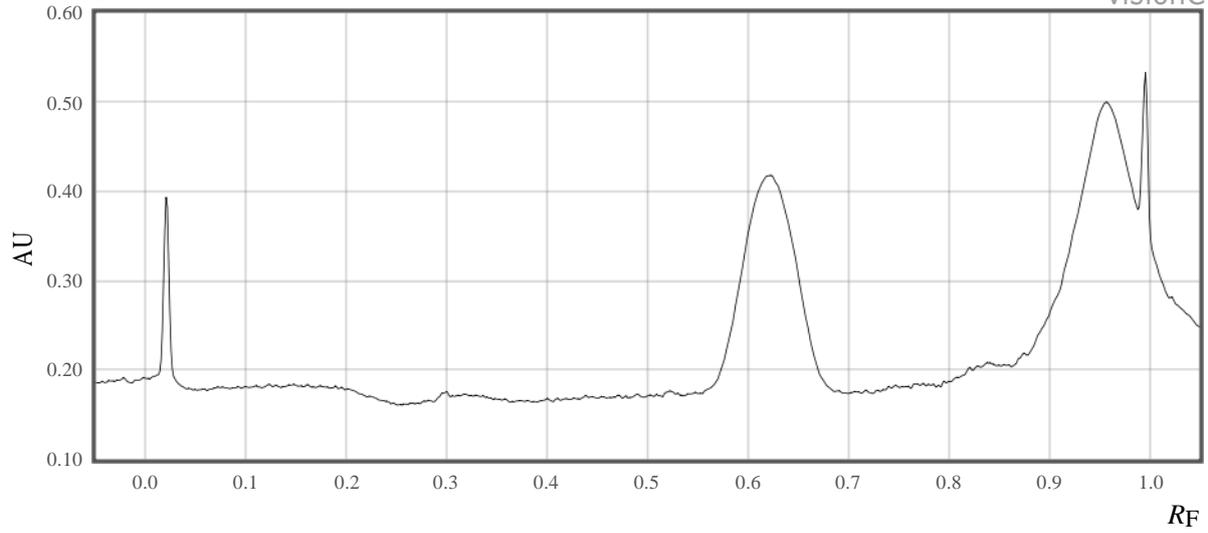
Wavelength 254 nm



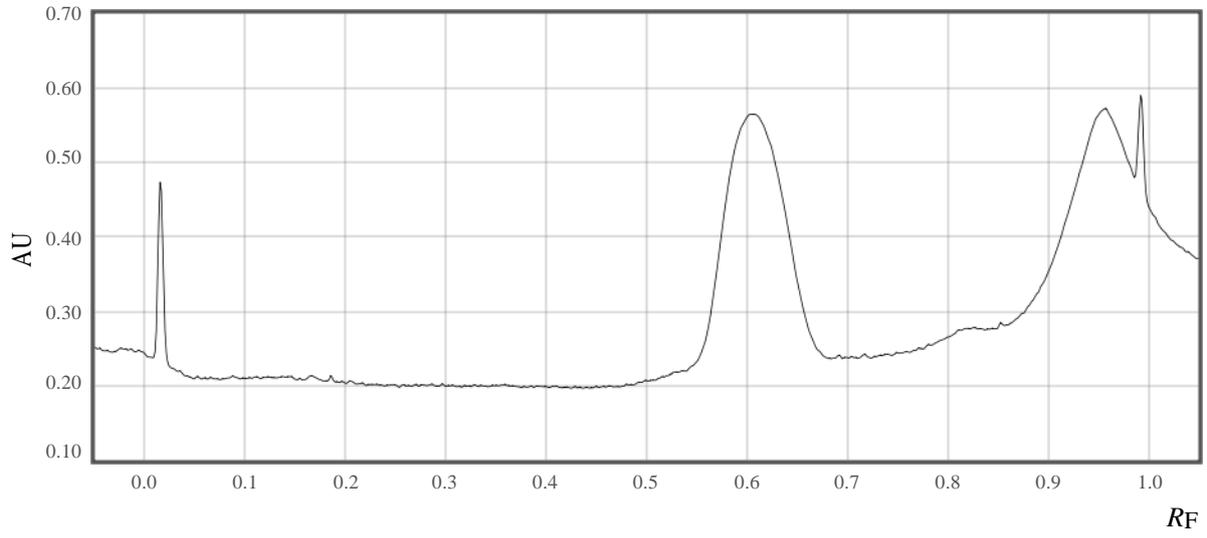
Track 2:

Lilik Nur

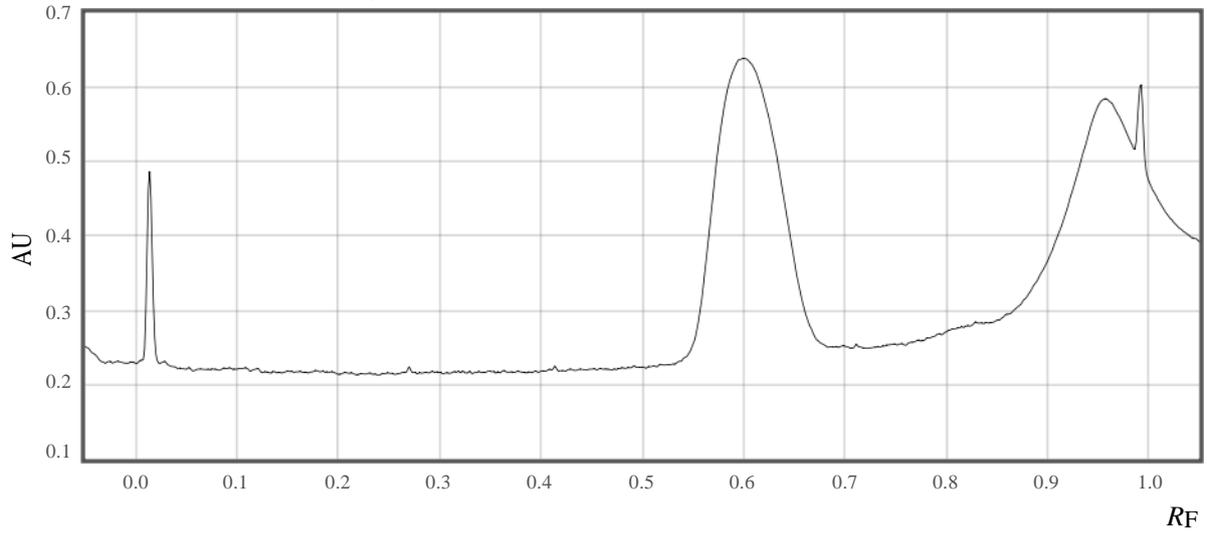
visionC



Track 5: visionC
Type: Single λ



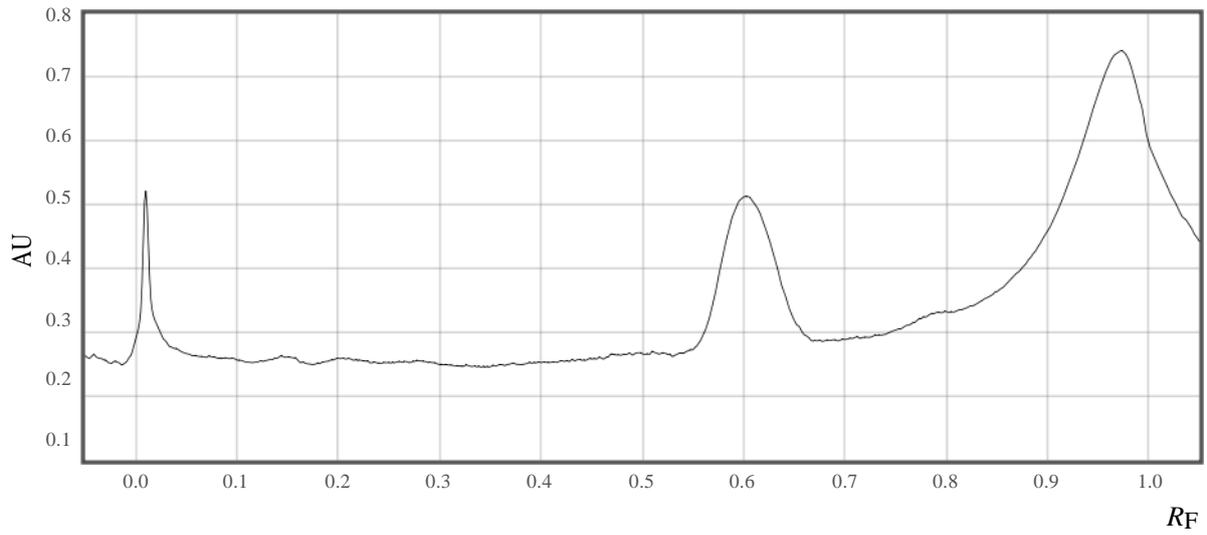
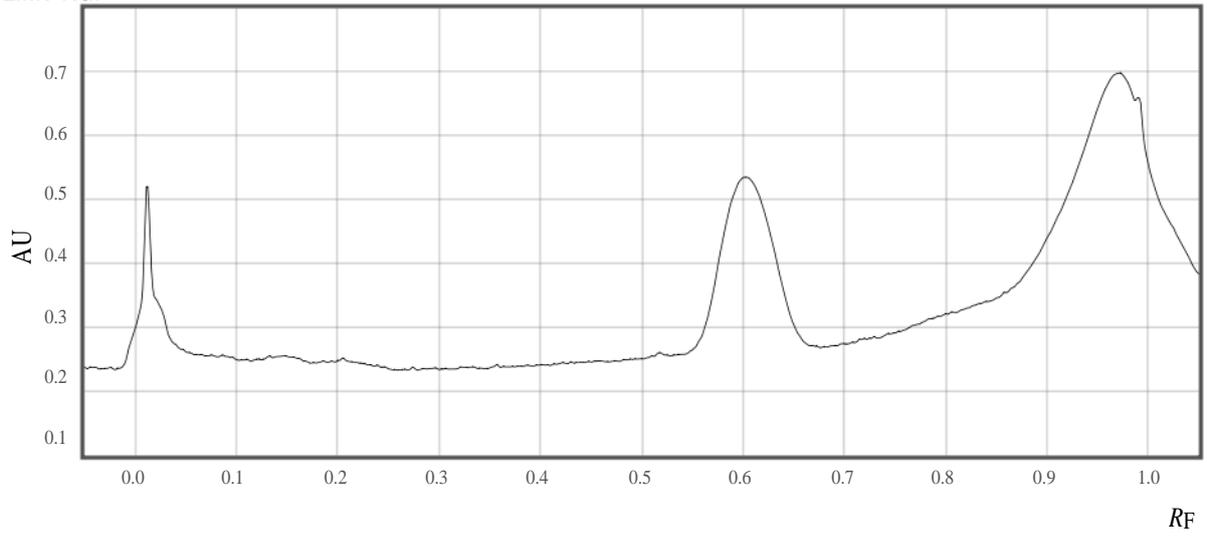
Track 6:
Type: Single λ



Track 7:
Type: Single λ

Lilik Nur

visionC



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

Executed 16-May-2023 14:27:35 visionCATSuser

Scan:

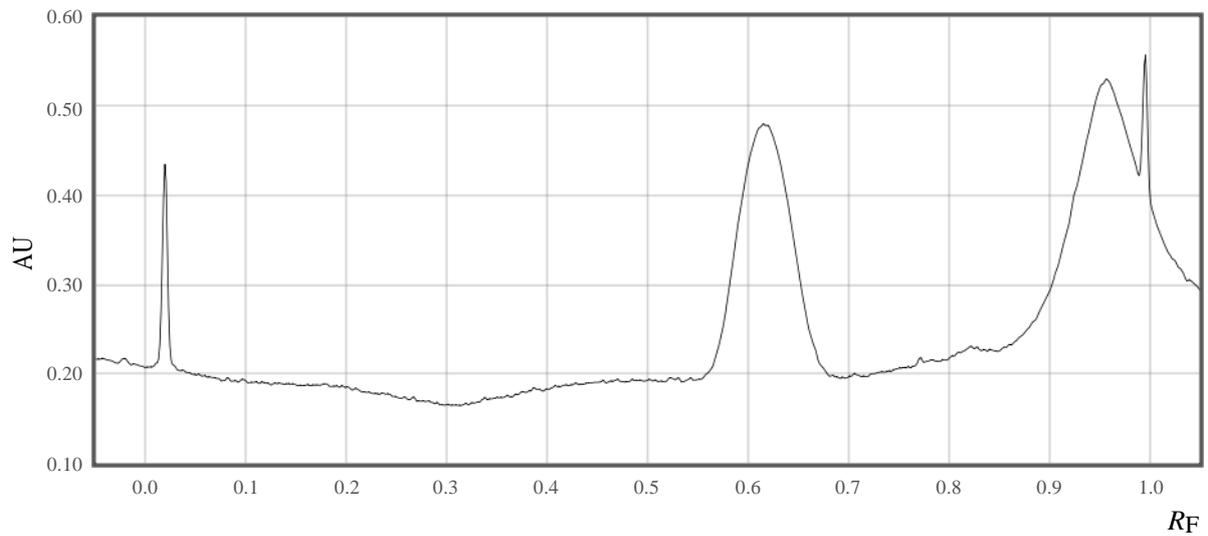
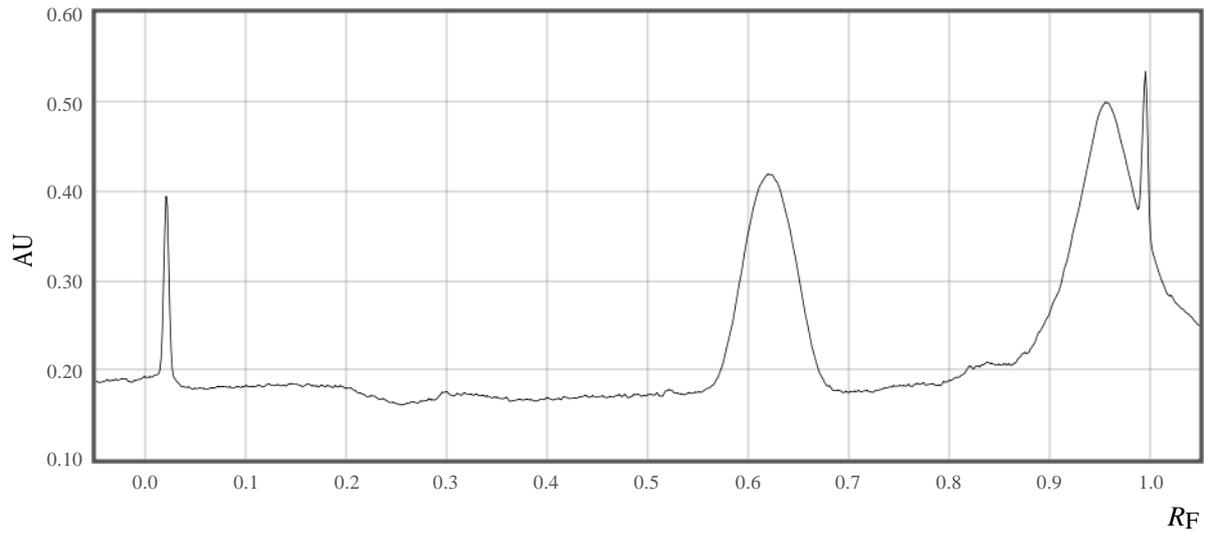
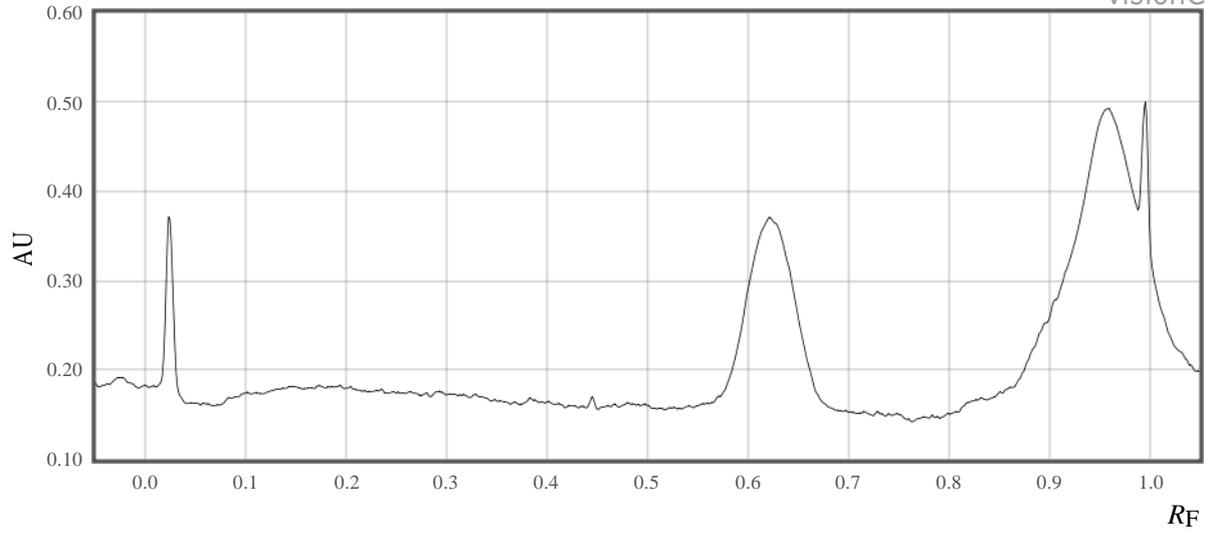
Wavelength 254 nm

Track 1:

Type Single λ

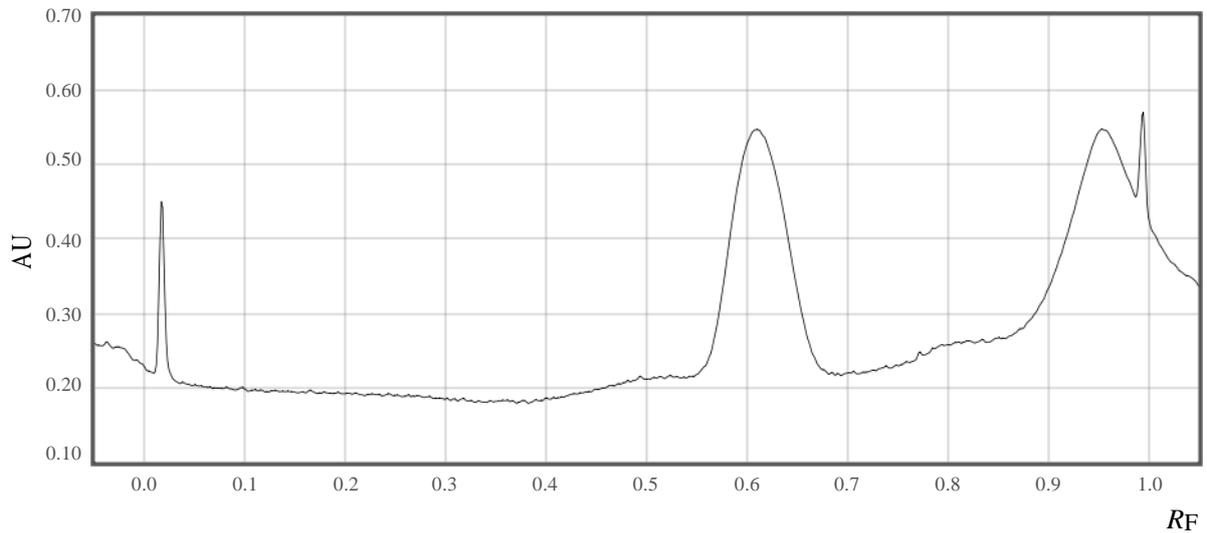
Lilik Nur

visionC



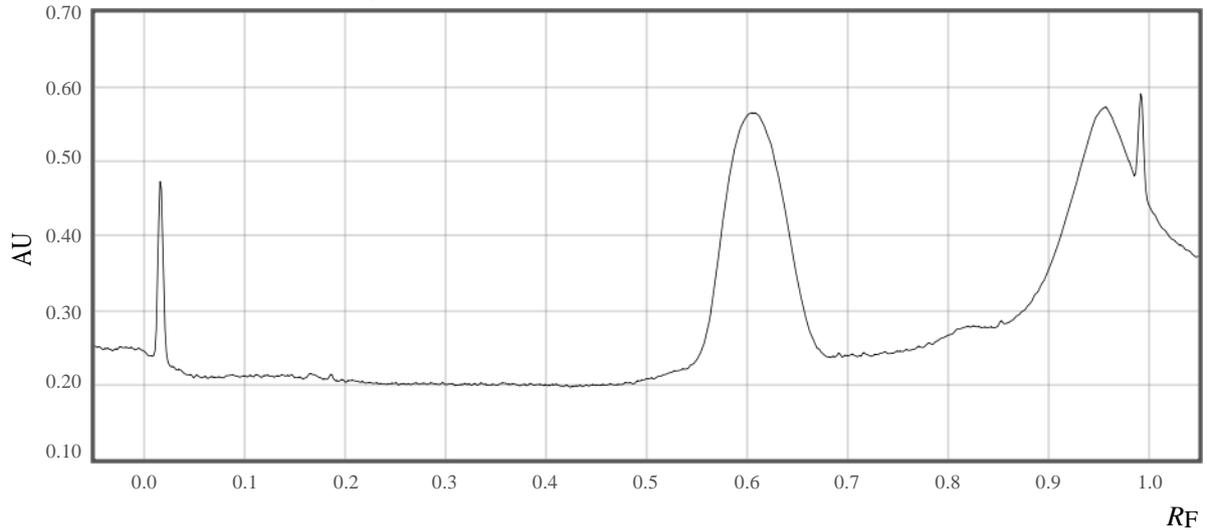
Track 4: visionC

Type Single λ



Track 5:

Type Single λ

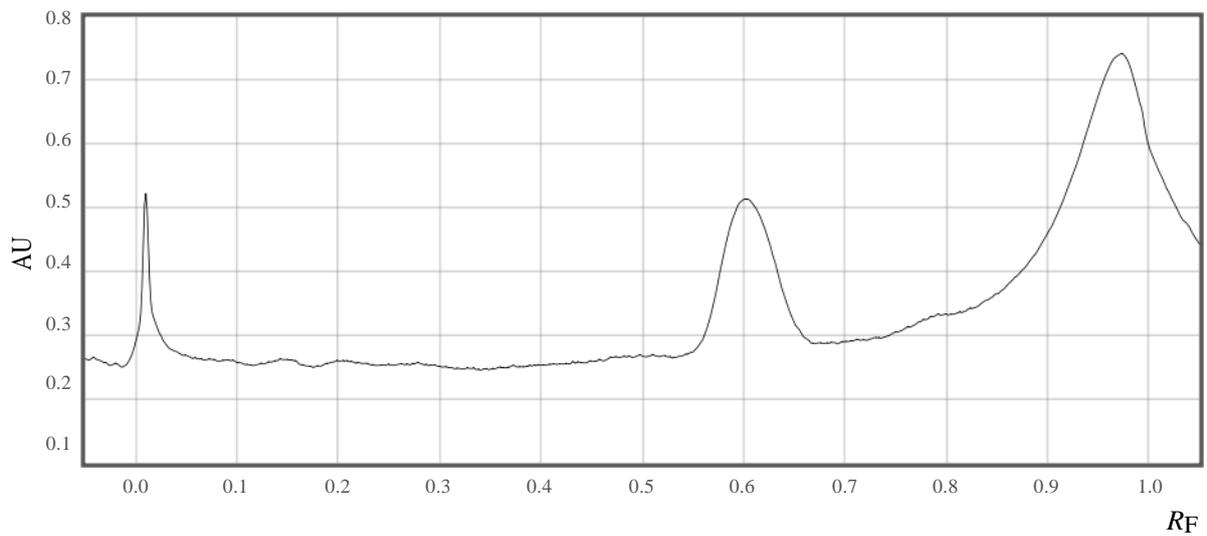
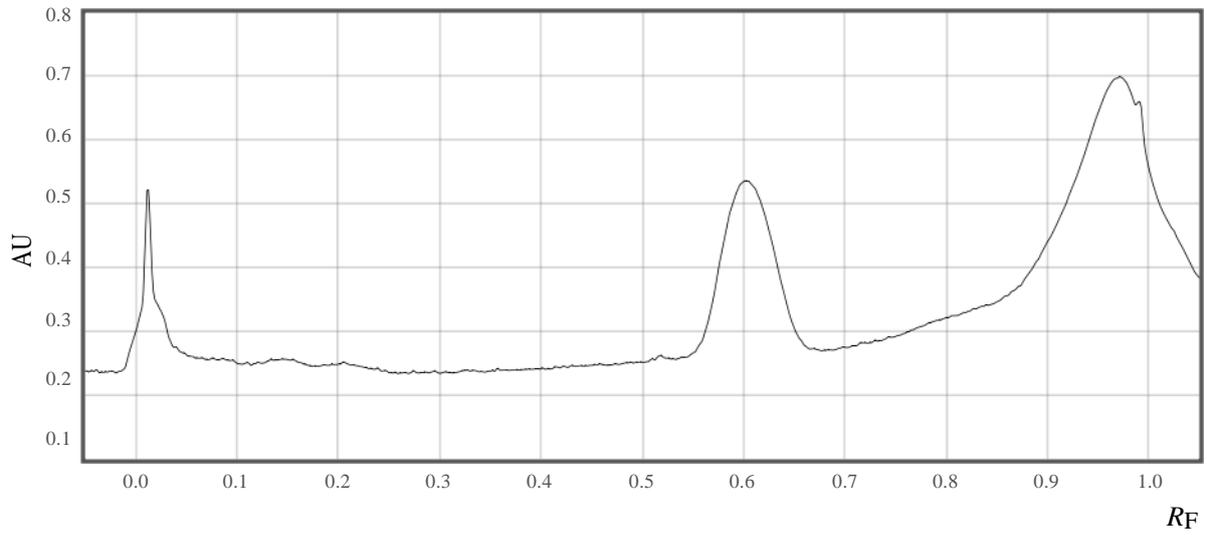
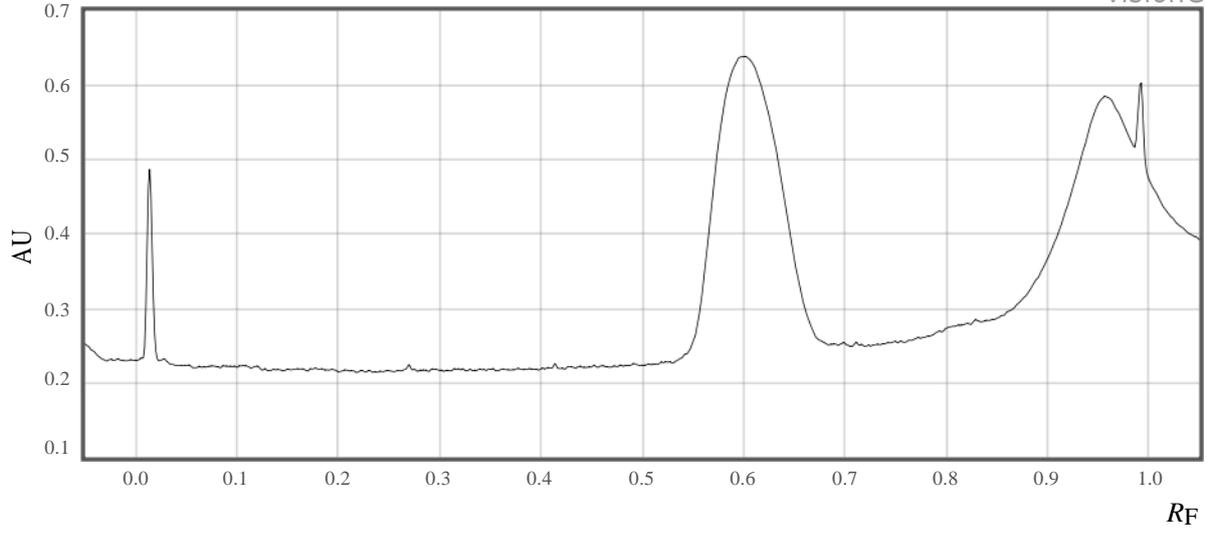


Track 6:

Type Single λ

Lilik Nur

visionC



Lilik Nur

visionC

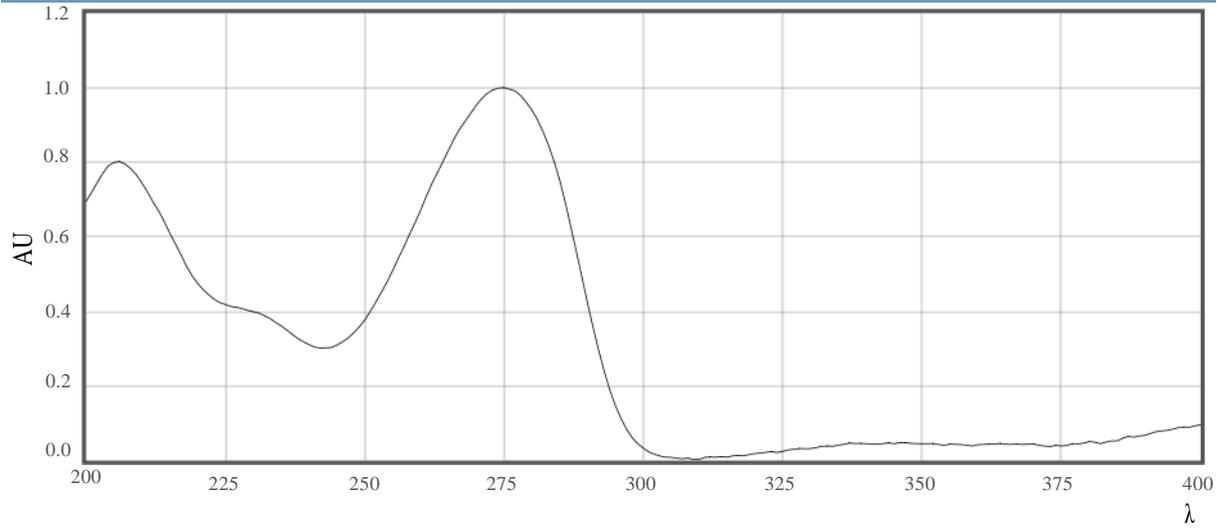
Spectrum Scan developed plate 1d - TLC Scanner 4 (S/N: 270739):

Executed

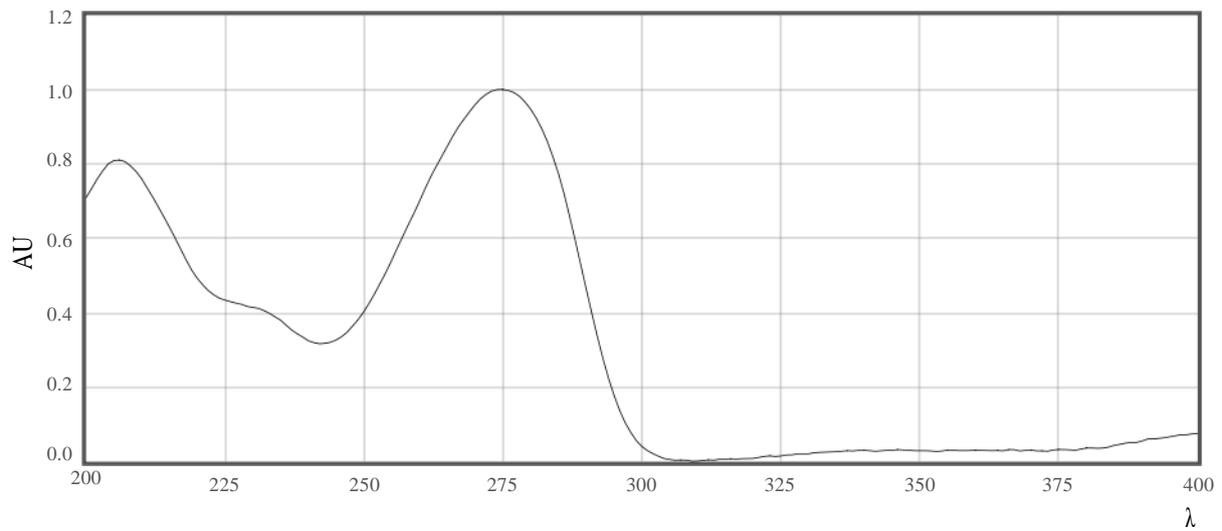
16-May-2023 14:35:18 visionCATSuser

Substance kafein (R_F 0.597 +/- 0.293):

Tr. 1 R_F 0.605 (10.0 mm, 58.4 mm)



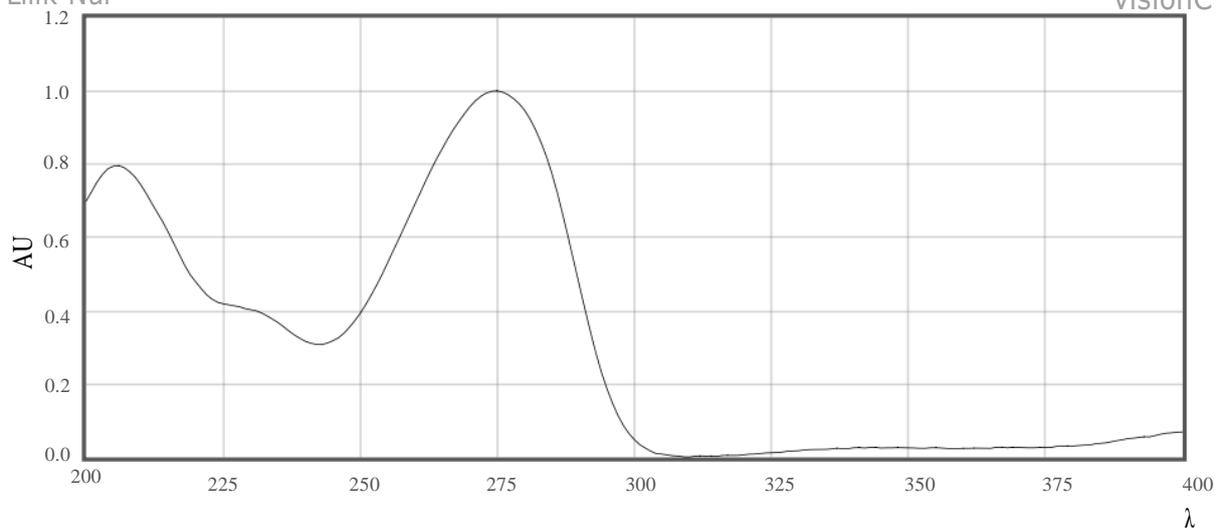
Tr. 2 R_F 0.610 (18.0 mm, 58.8 mm)



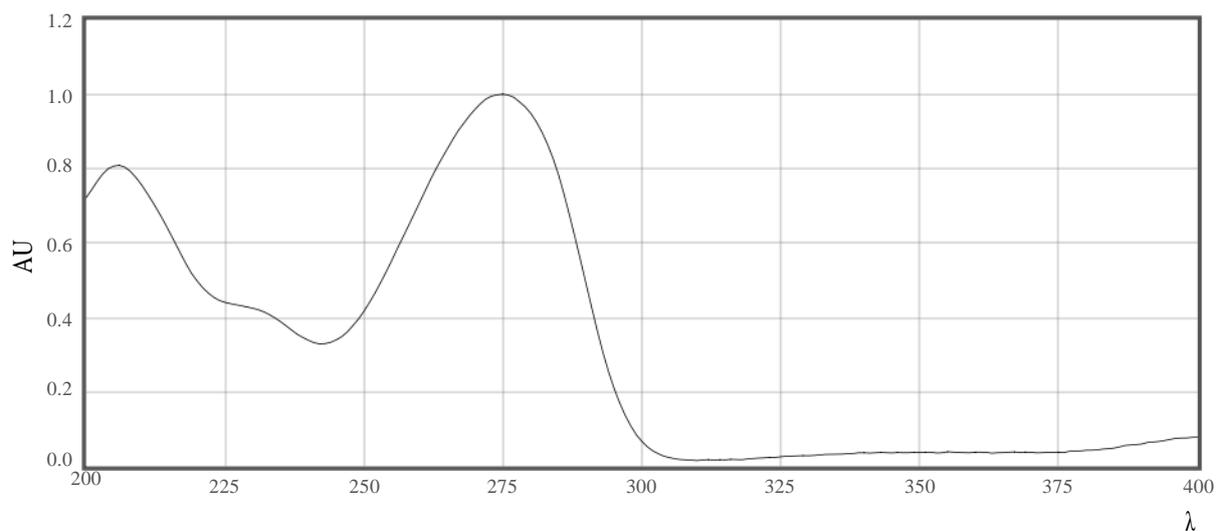
Tr. 3 R_F 0.615 (26.0 mm, 59.2 mm)

Lilik Nur

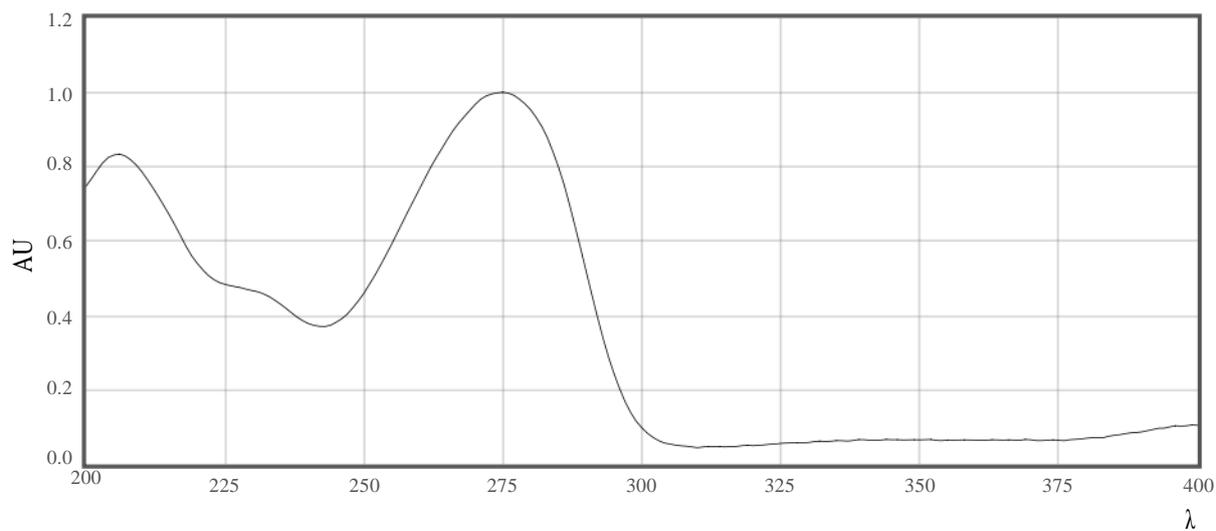
visionC



Tr. 4 R 0.620 (34.0 mm, 59.6 mm)

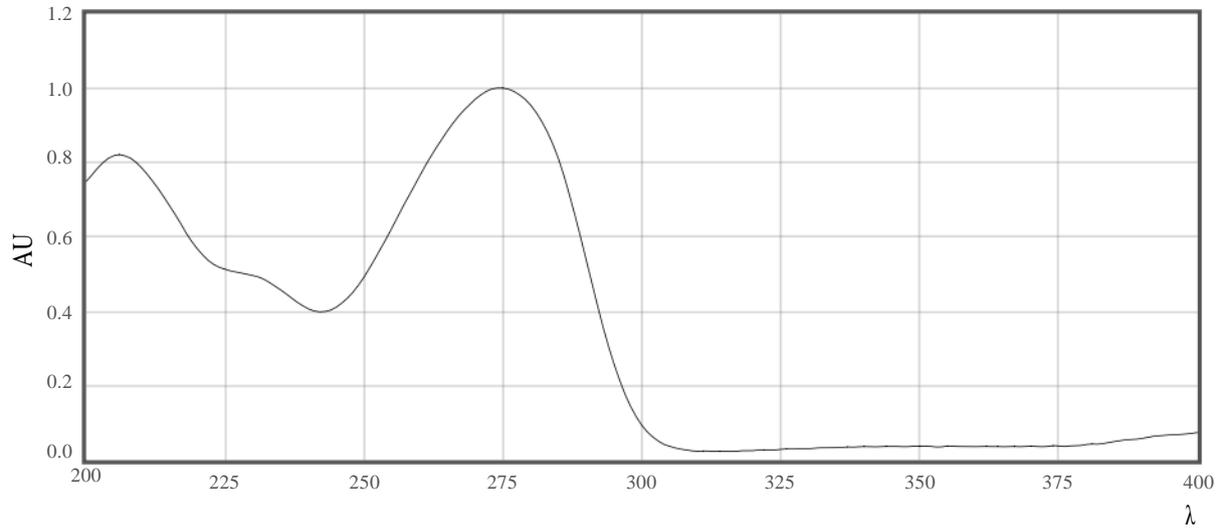


Tr. 5 R 0.623 (42.0 mm, 59.8 mm)

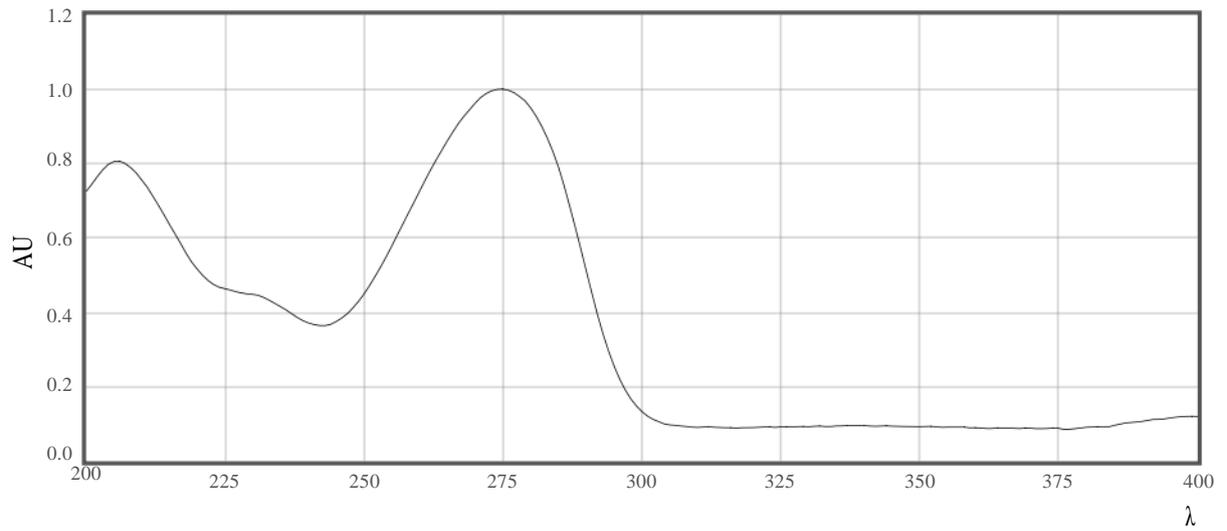


Lilik Nur

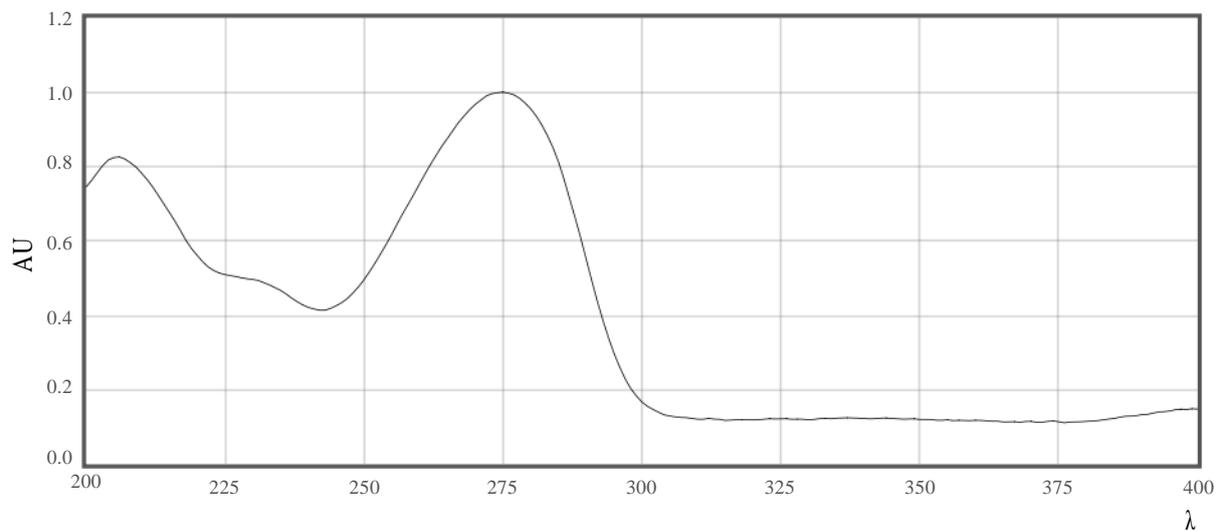
Tr. 6 R 0.601 (50.0 mm, 58.1 mm)



Tr. 7 R 0.603 (58.0 mm, 58.2 mm)



Tr. 8 R 0.603 (66.0 mm, 58.2 mm)



Lilik Nur visionC

Spectrum correlation data:

Substance name	Track	R _F	r(s,m)	r(e,m)	Ref. spectrum	Correlation
kafein	1	0.605	0.000000	0.000000	Tr. 2, Rf 0.610, Sub. kafein	0.999190
kafein	2	0.610	0.000000	0.000000	Tr. 1, Rf 0.605, Sub. kafein	0.999190
kafein	3	0.615	0.000000	0.000000	Tr. 2, Rf 0.610, Sub. kafein	0.999856
kafein	4	0.620	0.000000	0.000000	Tr. 3, Rf 0.615, Sub. kafein	0.999858
kafein	5	0.623	0.000000	0.000000	Tr. 4, Rf 0.620, Sub. kafein	0.999617
kafein	6	0.601	0.000000	0.000000	Tr. 5, Rf 0.623, Sub. kafein	0.998621
kafein	7	0.603	0.000000	0.000000	Tr. 5, Rf 0.623, Sub. kafein	0.999073
kafein	8	0.603	0.000000	0.000000	Tr. 5, Rf 0.623, Sub. kafein	0.999589

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

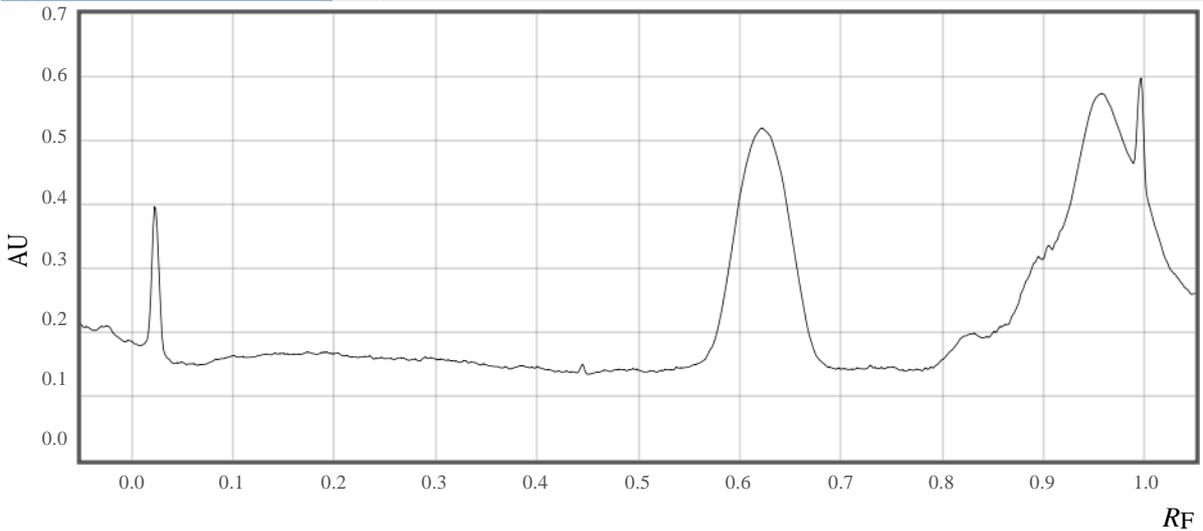
Executed 16-May-2023 14:38:16 visionCATSuser

Scan:

Wavelength 275 nm

Track 1:

Type Single λ

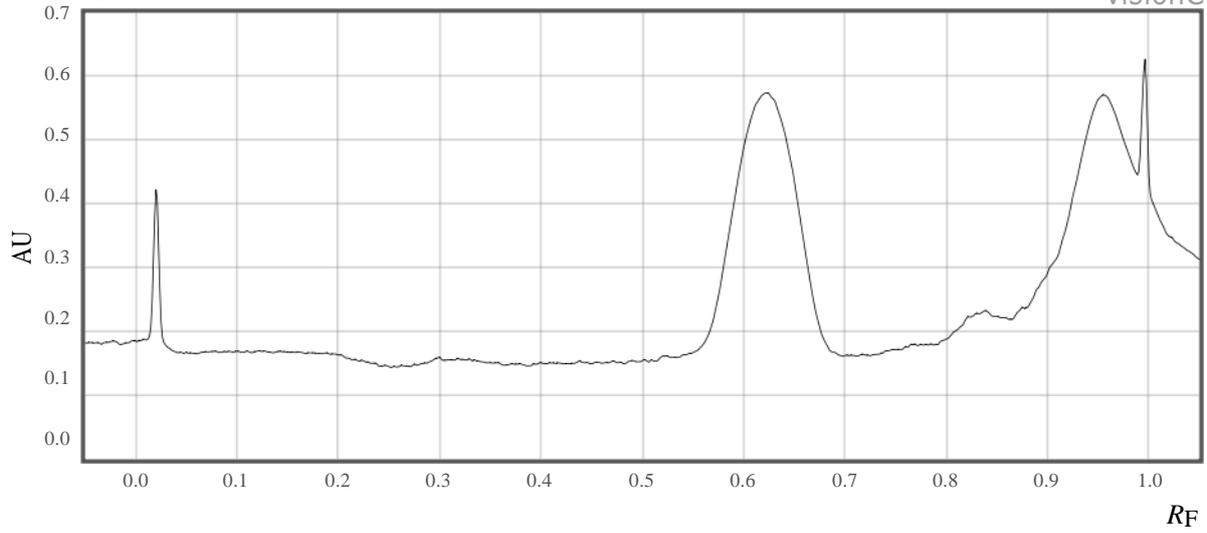


Track 2:

Type Single λ

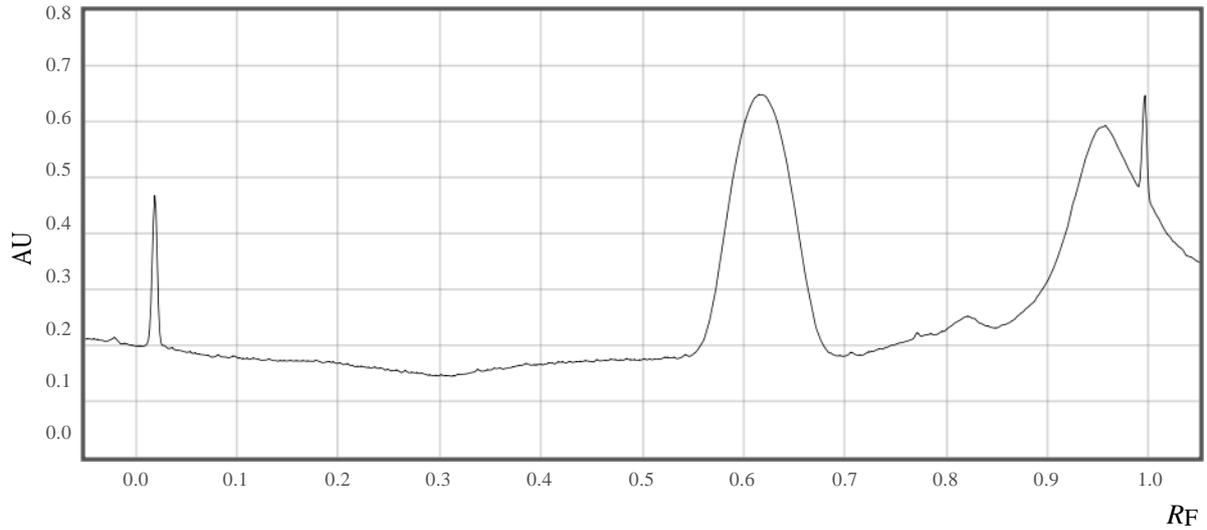
Lilik Nur

visionC



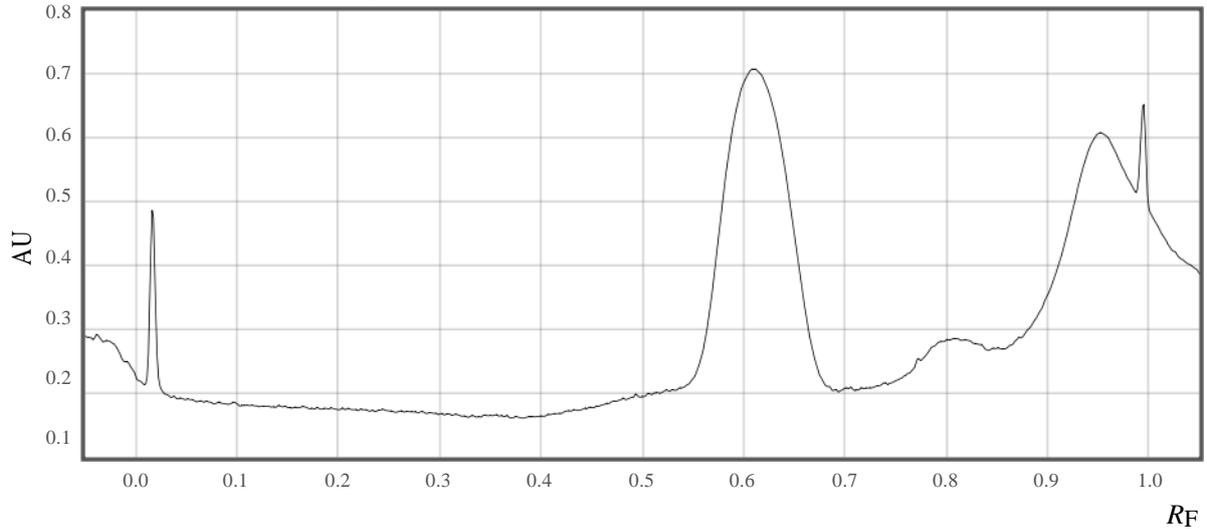
Track 3:

Type Single λ



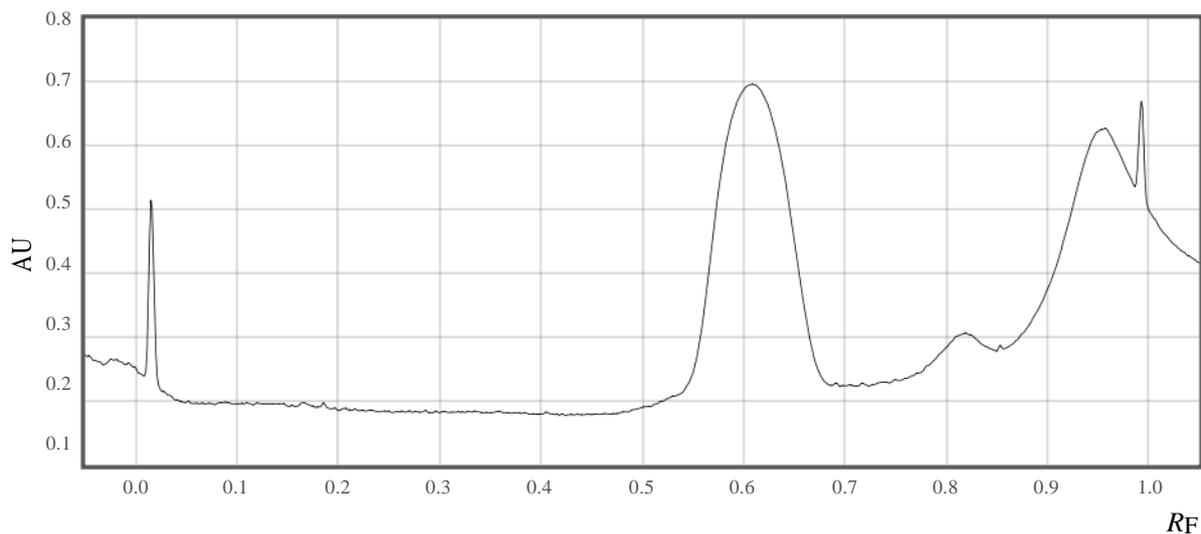
Track 4:

Type Single λ



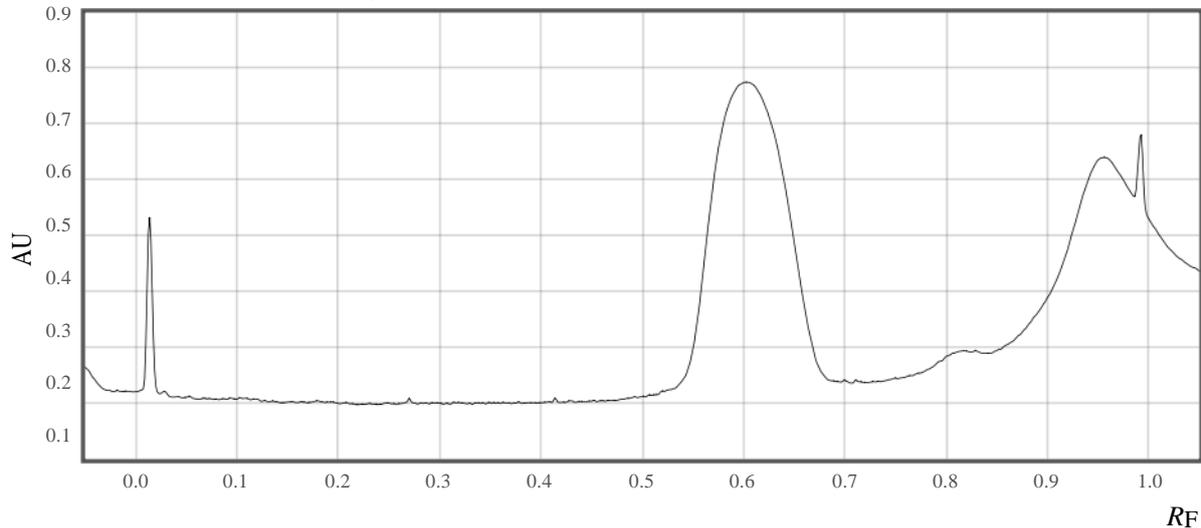
Track 5: visionC

Type: Single λ



Track 6:

Type: Single λ

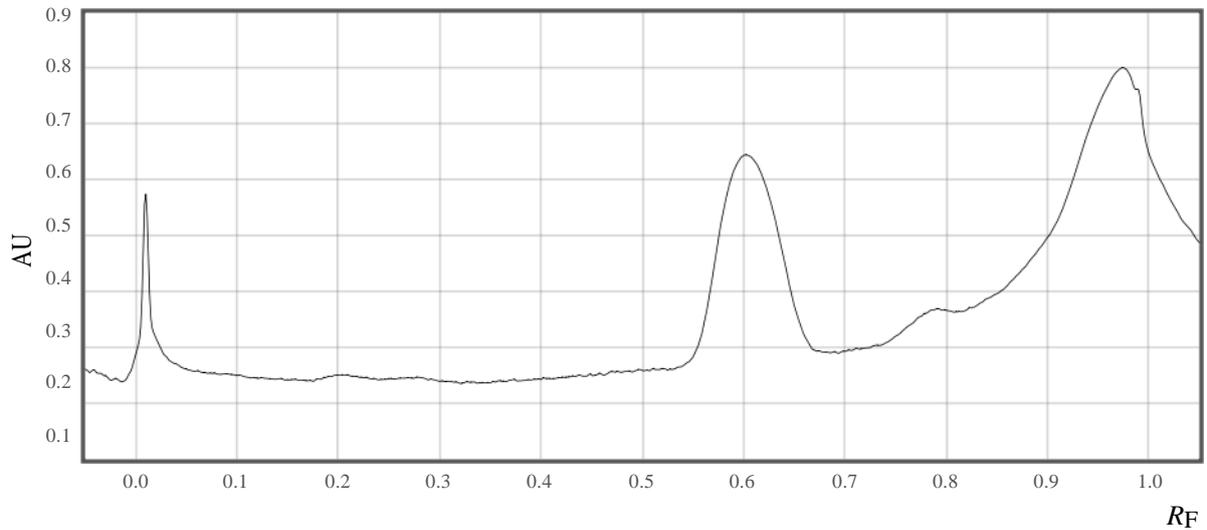
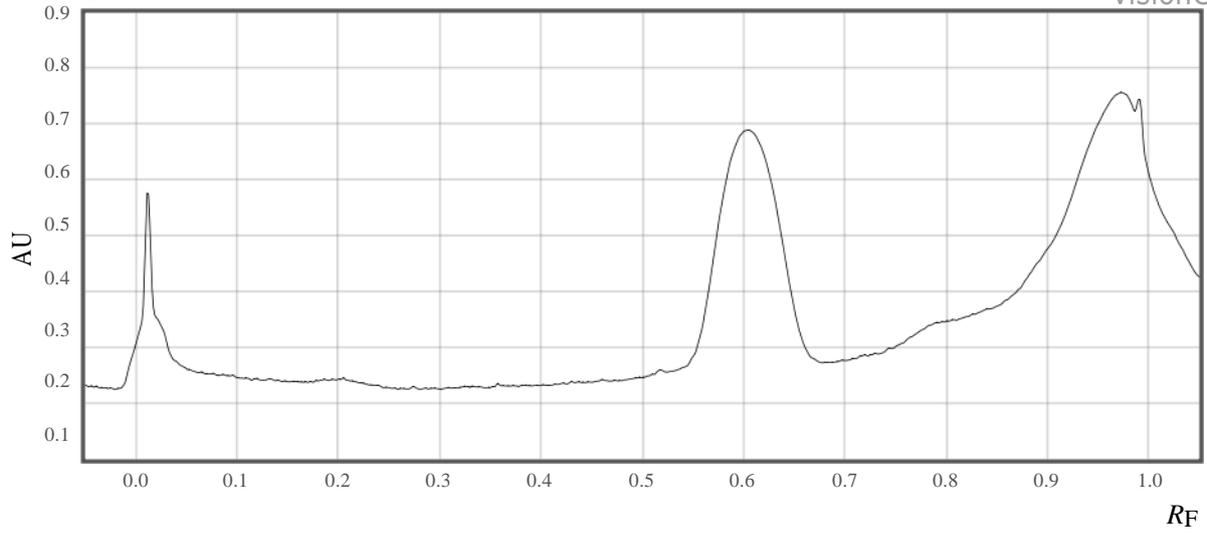


Track 7:

Type: Single λ

Lilik Nur

visionC



Evaluation 1 :

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

Definition:

References:

S1		
Substance Name	Concentration	Purity
cafein 2	200.000 µg/ml	100.00 %

S2		
Substance Name	Concentration	Purity
cafein 2	400.000 µg/ml	100.00 %

Substance Name	Concentration	Purity
cafein 2	600.000 µg/ml	100.00 %

Substance Name	Concentration	Purity
cafein 2	800.000 µg/ml	100.00 %

Substance Name	Concentration	Purity
cafein 2	1.000 mg/ml	100.00 %

Samples:

Vial ID	Amount	Volume solution	Reference amount	Related to
S6		0.00 ml		
S7		0.00 ml		
S8		0.00 ml		

Integration parameters:

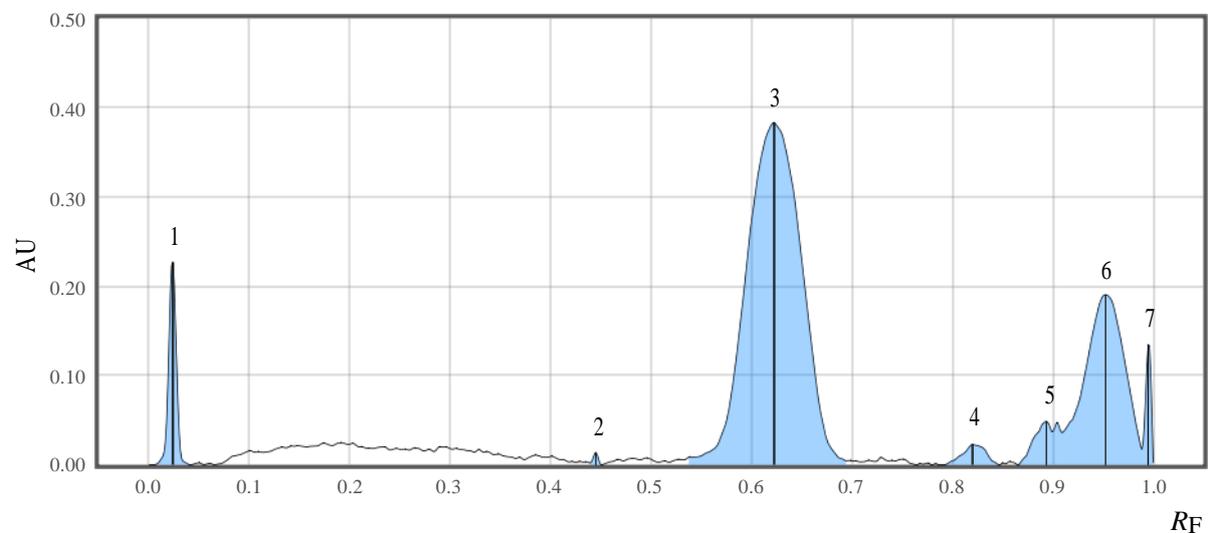
Bounds	[0.000,1.000]
Smoothing	Savitzky-Golay of order 3 and window 7
Baseline correction	Lowest slope with noise 0.05
Profile subtraction	None
Peaks detection	Gauss (legacy) with sensitivity 0.1, separation 1 and threshold 0.1

Scan:

Wavelength	275 nm
------------	--------

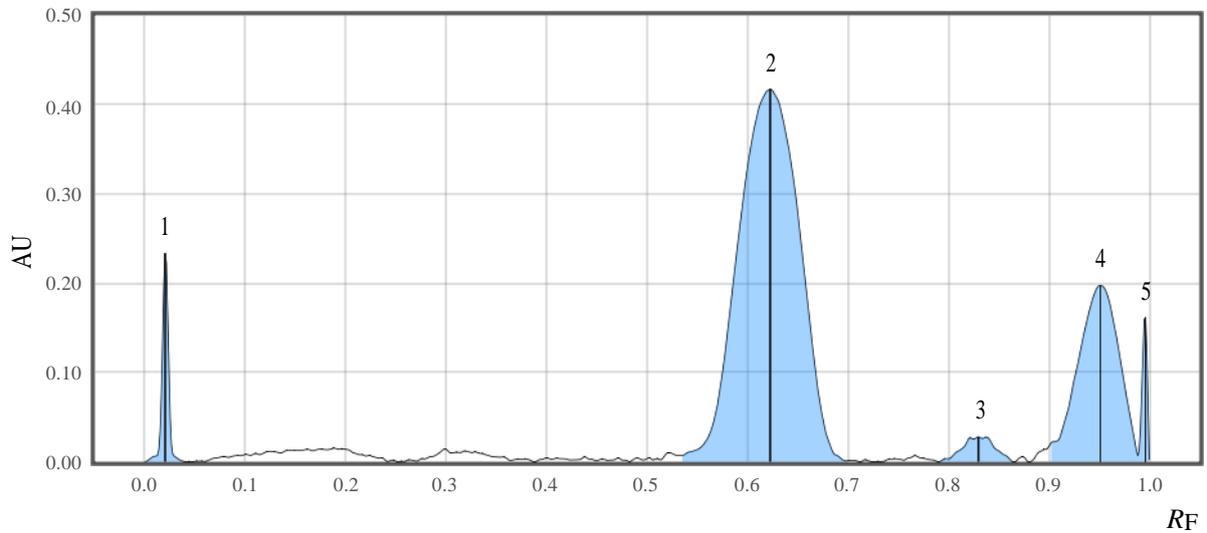
Track 1:

Type	Reference
Vial ID	S1
Description	STD 1
Volume	5.0 µl



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.005	0.0000	0.024	0.2267	22.25	0.041	0.0000	0.00202	5.29	No	cafein 2
2	0.439	0.0021	0.445	0.0138	1.35	0.451	0.0000	0.00008	0.21	No	
3	0.535	0.0066	0.623	0.3828	37.56	0.695	0.0044	0.02322	64.06	No	
4	0.792	0.0000	0.820	0.0228	2.23	0.846	0.0000	0.00061	1.61	No	
5	0.865	0.0000	0.894	0.0484	4.75	0.909	0.0362	0.00134	3.52	No	
6	0.909	0.0362	0.953	0.1903	18.68	0.989	0.0173	0.00877	23.03	No	
7	0.989	0.0173	0.995	0.1343	13.18	1.000	0.0024	0.00087	2.29	No	

Track 2:	
Type	Reference
Vial ID	S2
Description	STD 2
Volume	5.0 µl

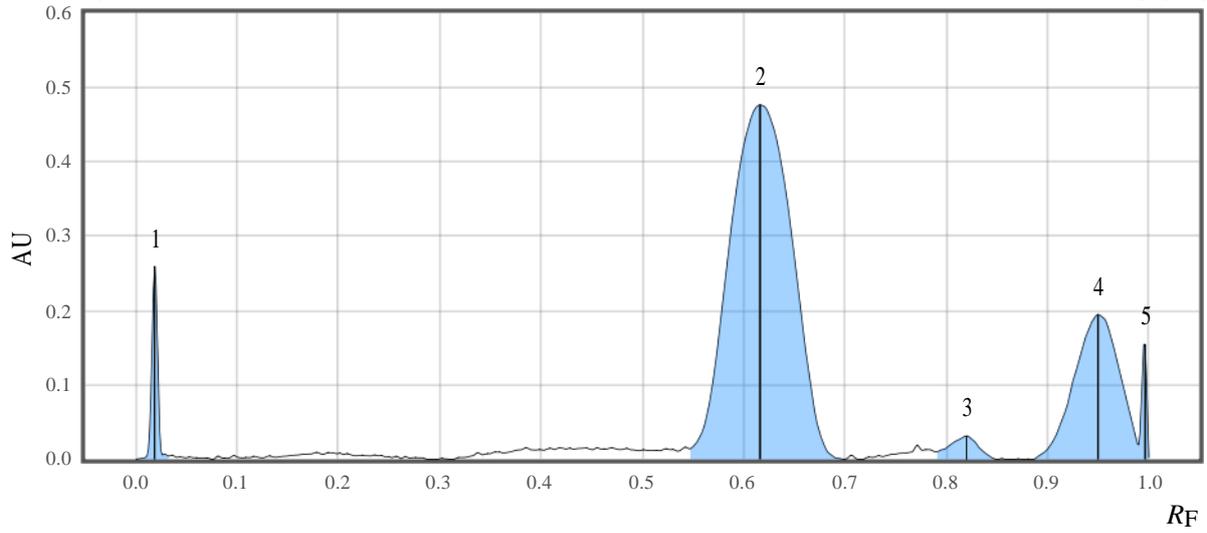


Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.020	0.2336	22.51	0.040	0.0000	0.00168	3.92	No	cafein 2
2	0.535	0.0069	0.623	0.4170	40.19	0.699	0.0010	0.02764	69.30	No	
3	0.791	0.0002	0.830	0.0278	2.68	0.865	0.0000	0.00107	2.50	No	
4	0.900	0.0171	0.951	0.1974	19.03	0.989	0.0069	0.00943	22.06	No	
5	0.989	0.0069	0.996	0.1617	15.58	1.000	0.0023	0.00095	2.22	No	

Track 3:	
Type	Reference
Vial ID	S3
Description	STD 3
Volume	5.0 µl

Lilik Nur

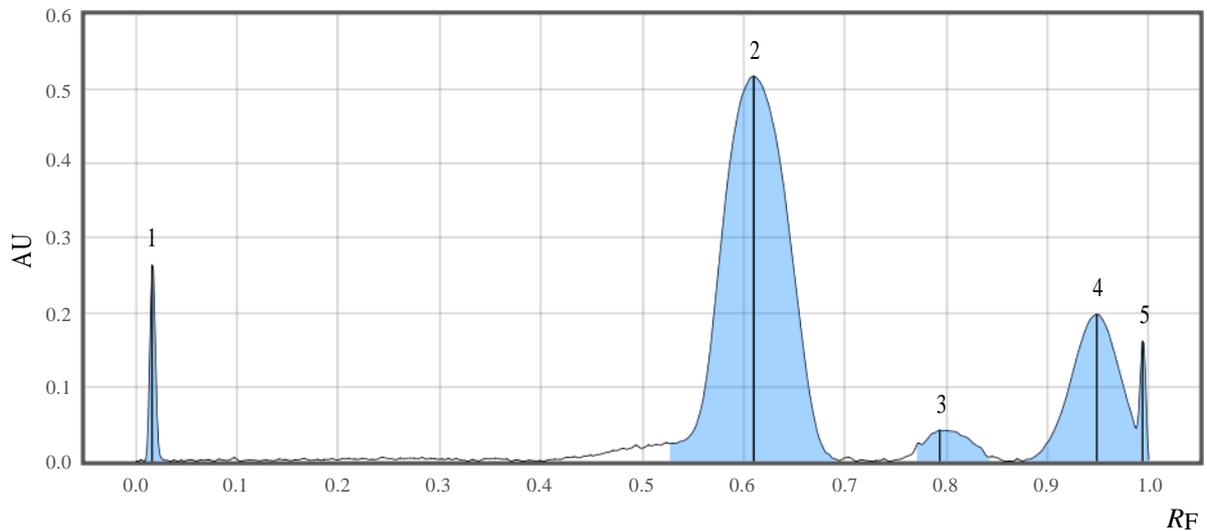
visionC



Peak #	Start		Max		%	End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H		R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.019	0.2592	23.24	0.033	0.0043	0.00172	3.59	No	
2	0.546	0.0141	0.616	0.4761	42.69	0.699	0.0000	0.03416	71.35	No	cafein 2
3	0.790	0.0100	0.820	0.0314	2.81	0.850	0.0000	0.00104	2.16	No	
4	0.886	0.0000	0.950	0.1946	17.45	0.990	0.0195	0.01008	21.05	No	
5	0.990	0.0195	0.996	0.1540	13.81	1.000	0.0023	0.00088	1.84	No	

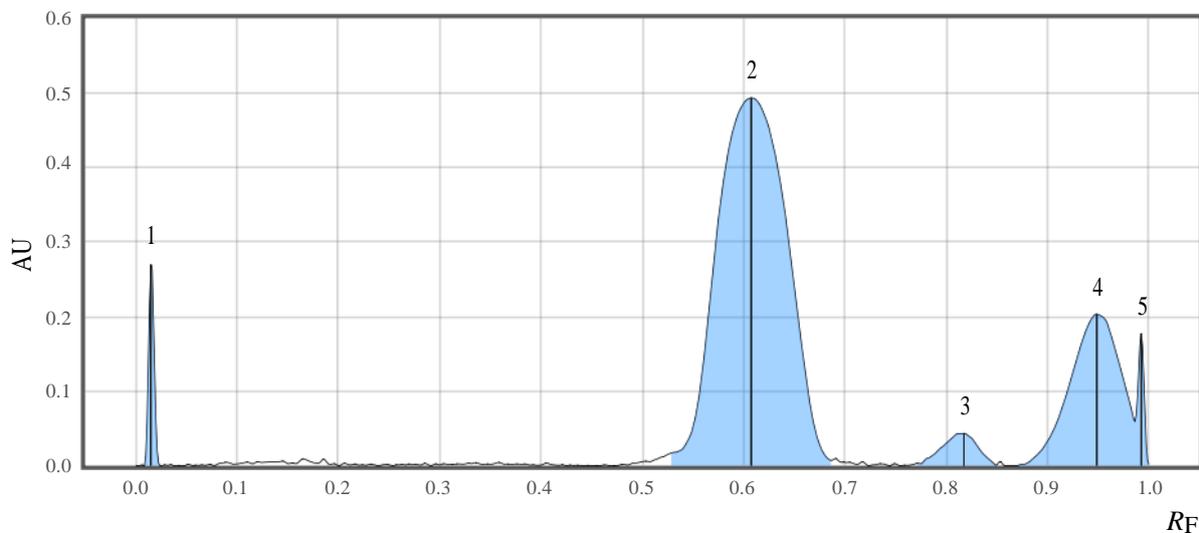
Track 4:

Type	Reference
Vial ID	S4
Description	STD 4
Volume	5.0 µl



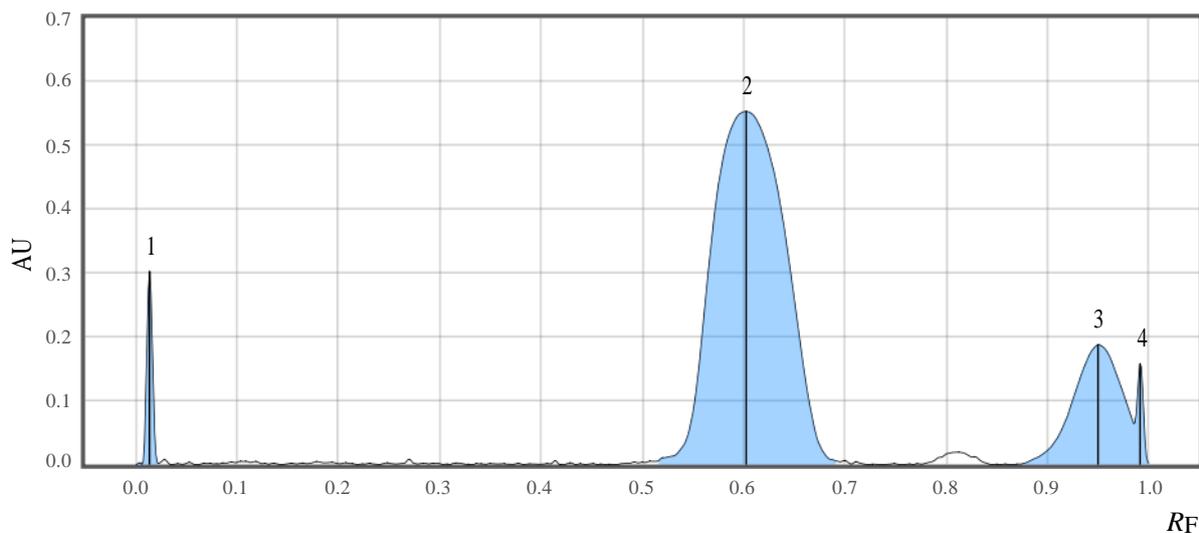
Peak #	Start		Max		%	End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H		R _F	H	A	%		
1	0.009	0.0000	0.016	0.2636	22.32	0.034	0.0000	0.00173	3.14	No	
2	0.527	0.0237	0.610	0.5171	43.78	0.694	0.0009	0.03806	70.97	No	cafein 2
3	0.770	0.0192	0.794	0.0419	3.54	0.843	0.0056	0.00218	3.97	No	
4	0.875	0.0000	0.949	0.1974	16.71	0.988	0.0440	0.01091	19.82	No	
5	0.988	0.0440	0.994	0.1612	13.65	1.000	0.0020	0.00115	2.09	No	

Track 5:	
Type	Reference
Vial ID	S5
Description	STD 5
Volume	5.0 µl



Peak #	Start		Max		%	End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H		R _F	H	A	%		
1	0.007	0.0000	0.015	0.2697	22.74	0.025	0.0000	0.00172	3.04	No	
2	0.526	0.0157	0.608	0.4929	41.55	0.686	0.0072	0.04408	70.66	No	cafein 2
3	0.769	0.0024	0.818	0.0433	3.65	0.849	0.0006	0.00181	3.20	No	
4	0.870	0.0000	0.949	0.2032	17.13	0.986	0.0593	0.01175	20.81	No	
5	0.986	0.0593	0.993	0.1772	14.94	1.000	0.0019	0.00129	2.28	No	

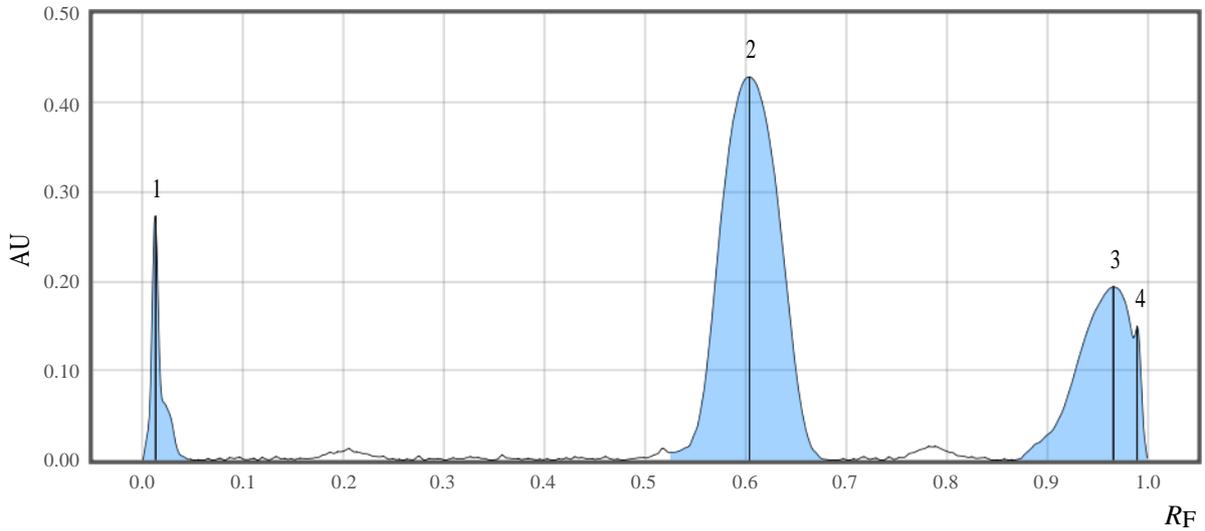
Track 6:	
Type Vial	Sample
ID	S6
Description	REP 1
Volume	5.0 µl



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.014	0.3032	25.21	0.022	0.0018	0.00196	3.25	No	cafein 2
2	0.516	0.0064	0.603	0.5536	46.03	0.694	0.0049	0.02358	77.60	No	
3	0.868	0.0000	0.950	0.1879	15.62	0.985	0.0643	0.01029	17.10	No	
4	0.985	0.0643	0.991	0.1580	13.14	1.000	0.0020	0.00123	2.04	No	

Track 7:

Type	Sample
Vial ID	S7
Description	REP 2
Volume	5.0 µl



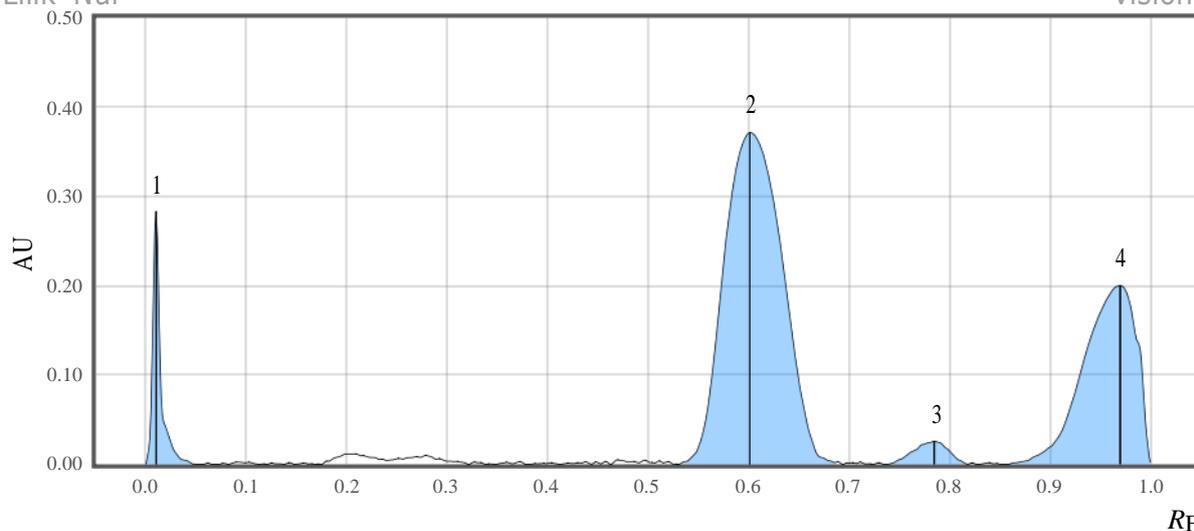
Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H	%	R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.0130	0.2735	26.14	0.045	0.0008	0.00298	6.60	No	cafein 2
2	0.525	0.0083	0.604	0.4289	41.00	0.679	0.0007	0.02412	65.20	No	
3	0.868	0.0000	0.9660	0.1939	18.54	0.986	0.1367	0.01149	25.44	No	
4	0.986	0.1367	0.990	0.1497	14.31	1.000	0.0020	0.00125	2.76	No	

Track 8:

Type	Sample
Vial ID	S8
Description	REP 3
Volume	5.0 µl

Lilik Nur

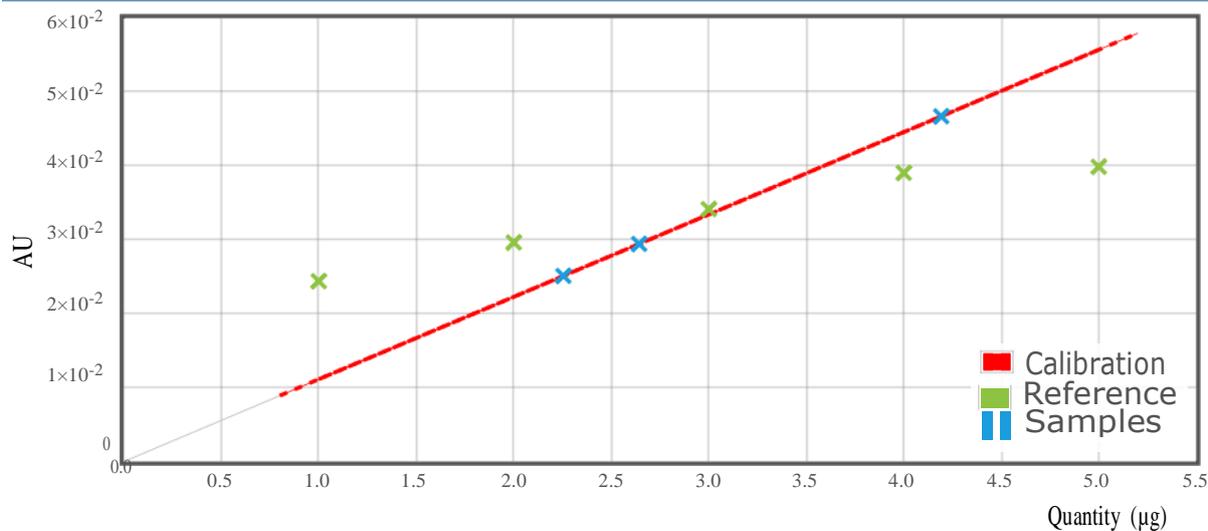
visionC



Peak #	Start		Max		%	End		Area		Manual peak	Substance Name
	R _F	H	R _F	H		R _F	H	A	%		
1	0.000	0.0000	0.010	0.2833	32.17	0.054	0.0000	0.00256	6.23	No	
2	0.530	0.0000	0.601	0.3714	42.18	0.686	0.0020	0.02499	61.14	No	cafein 2
3	0.736	0.0000	0.785	0.0259	2.94	0.819	0.0002	0.00105	2.56	No	
4	0.859	0.0000	0.970	0.1999	22.70	1.000	0.0021	0.01236	30.08	No	

Calibration results:

Area calibration for substance cafein 2 @ 275 nm:



Regression mode	Linear-1
Range deviation	5.00 %
Related substances	Default
Number of references	5
Calibration function	$Y = 0,000003 + 0,0178$
Coefficient of variation	CV 30.25 %
Correlation coefficient	R=0,9952

Results:

cafein 2 (3 sample assignments) @ 275 nm			
Sample 'S6'	838.4 µg/ml	(CV unavai lable)	(1 applica tions)
Volume: 5.0 µl	838.4 µg/ml	(CV unavai lable)	(1 replicas)
Track 6	838.4 µg/ml	4.192 µg	
Sample 'S7'	528.5 µg/ml	(CV unavai lable)	(1 applica tions)
Volume: 5.0 µl	528.5 µg/ml	(CV unavai lable)	(1 replicas)
Track 7	528.5 µg/ml	2.643 µg	
Sample 'S8'	450.9 µg/ml	(CV unavai lable)	(1 applica tions)
Volume: 5.0 µl	450.9 µg/ml	(CV unavai lable)	(1 replicas)
Track 8	450.9 µg/ml	2.254 µg	

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

Analyst:

Reviewer: