

**VALIDASI METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS PADA PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA**  
*(Coffea canephora)*

**SKRIPSI**



Oleh :  
**Rikza Ilmiana**  
**NIM 18040089**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI**  
**FAKULTAS ILMU KESEHATAN**  
**UNIVERSITAS dr. SOEBANDI**  
**JEMBER**  
**2022**

**VALIDASI METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS PADA PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA**  
*(Coffea canephora)*

**SKRIPSI**

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



Oleh :  
**Rikza Ilmiana**  
**NIM 18040089**

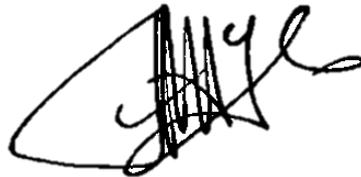
**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI**  
**FAKULTAS ILMU KESEHATAN**  
**UNIVERSITAS dr. SOEBANDI**  
**JEMBER**  
**2022**

## LEMBAR PERSETUJUAN

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

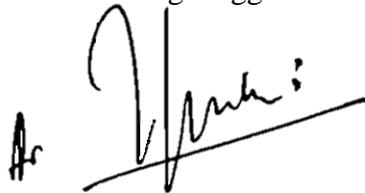
Jember, 26 September 2022

Pembimbing Utama



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

Pembimbing Anggota



Arief Judi Susilo, M. Kes.  
NIK. 196512179890031001

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis Pada Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)” telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada:

Hari : Rabu

Tanggal : 28 September 2022

Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi

Tim Penguji

Ketua Penguji,



apt. Sholihatil Hidayati, M.Farm.  
NIDN. 0509088601

Penguji II,



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

Penguji III,



Arief Judi Susilo, M. Kes.  
NIK. 196512179890031001

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan,  
Universitas dr. Soebandi



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

## PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Rikza Ilmiana  
NIM : 18040089  
Program Studi : Sarjana Farmasi

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

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

Jember, 28 September 2022

Yang menyatakan

  
  
(Rikza Ilmiana)

## **SKRIPSI**

# **VALIDASI METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS PADA PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)**

Oleh:

Rikza Ilmiana

NIM. 18040089

Pembimbing

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

Dosen pembimbing Anggota : Arief Judi Susilo, M. Kes.

## PERSEMBAHAN

Alhamdulillah segala puji Allah SWT dengan kemurahan dan ridho-Nya, skripsi ini dapat ditulis dengan baik dan lancar hingga selesai. Dengan ini akan saya persembahkan skripsi ini kepada:

1. **Tuhan saya**, Allah SWT karena hanya atas izin dan karunia-Nya skripsi ini dapat dibuat dan selesai tepat pada waktunya. Puji syukur yang tak terhingga pada Allah SWT yang telah meridhoi dan mengabulkan segala doa.
2. **Nabi saya**, Nabi Muhammad SAW sebagai panutan umat muslim yang penuh dengan kemuliaan dan ketaatan kepada Allah SWT memberi saya motivasi tentang kehidupan dan mengajari saya hidup melalui sunnah-sunnahnya.
3. **Kedua orang tua saya**, H. Fauzan (Bapak) dan Hj. Sri Wahyuni (Mama) skripsi ini adalah persembahan kecil saya untuk mereka. Terima kasih karena selalu menjaga saya dalam doa-doa serta selalu membiarkan saya mengejar impian saya apapun itu.
4. **Saudara kandung saya**, Ns. Nadhifa, S. Kep. (Kakak) dan Zulfia Qotrun Nada (Adik).
5. **Segenap Bapak dan Ibu Dosen Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi**, yang telah memberikan banyak ilmu dan pengalaman selama perkuliahan.
6. **Almamater saya**, Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi Jember.

7. **Teman-teman kontrakan Patrang Asri C-2**, Puji Tri Wulandari (Mbak Puj), Siti Mutma'innah (Mama Ina), Retno Wulandari (Nok), Rinta Ananda Putri (Ruinta), Halimatus Zahroh (Jalllll), Pryastika Socajiwa (Soc), dan Yeni Febrianti (Yeni Inka) terima kasih telah menyediakan pundak untuk menangis dan memberi bantuan saat aku membutuhkannya. Terima kasih sudah menjadi temanku.
8. **Muhammad Yazril Haryadi**, yang telah menemani saya selama penelitian berlangsung dan memberikan semangat dalam penyusunan skripsi ini.
9. **Teman satu angkatan**, terutama kelas 18B yang telah banyak menemani selama menempuh pendidikan farmasi di Universitas dr. Soebandi, canda, tawa, dan banyak momen yang telah kita lewati bersama.
10. **Diri saya sendiri**, yang mau dan mampu bertahan, berjuang, berusaha sekuat yang saya bisa, tidak menyerah walau banyak godaan yang datang untuk berhenti, terima kasih karena sudah bertahan untuk tetap kuat sampai detik ini.
11. **Semua pihak yang telah bertanya “Kapan wisuda?”**, karena kalian adalah alasanmu untuk segera menyelesaikan skripsi ini.
12. **Pendamping hidup saya (kelak)**, secara khusus saya persembahkan skripsi ini walaupun hingga detik saat skripsi ini selesai saya masih belum tahu keberadaanmu berada.

## **MOTTO**

Dan (ingatlah) ketika Tuhanmu memaklumkan, "Sesungguhnya jika kamu bersyukur, niscaya Aku akan menambah (nikmat) kepadamu, tetapi jika kamu mengingkari (nikmat-Ku), maka pasti azab-Ku sangat berat."

**(QS. Ibrahim Ayat 7)**

(Ingatlah), ketika Yusuf berkata kepada ayahnya, "Wahai ayahku! Sungguh, aku (bermimpi) melihat sebelas bintang, matahari dan bulan; kulihat semuanya sujud kepadaku."

**(QS. Yusuf Ayat 4)**

"Hai orang-orang yang beriman, jadikanlah sabar dan shalat sebagai penolongmu, sesungguhnya Allah bersama orang-orang yang sabar,"

**(QS. Al-Baqarah Ayat 153)**

"Wahai orang-orang yang beriman, Bersabarlah kamu dan kuatkanlah kesabaranmu dan tetaplah bersiap-siaga dan bertakwalah kepada Allah agar kamu beruntung,"

**(QS. Ali Imran Ayat 200)**

"Barangsiapa yang berusaha menjaga diri, maka Allah menjaganya, barangsiapa yang berusaha merasa cukup, maka Allah mencukupinya. Barangsiapa yang berusaha bersabar, maka Allah akan menjadikannya bisa bersabar dan tidak ada seorang pun yang dianugerahi sesuatu yang melebihi kesabaran."

**(HR Bukhari No 1469)**

"Tidak ada seorang hamba yang meneguk satu tegukan (menerima musibah) yang lebih utama di sisi Allah dari pada satu tegukan yang berat yang ditahan untuk mencari ridha Allah ta'ala,"

**(HR Ahmad dan At-Tabran)**

## ABSTRAK

Ilmiana, Rikza\*. Setyaningrum, Lindawati\*\*. Judi Susilo, Arief\*\*\*. **Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis Pada Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*).** Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.

---

**Latar Belakang :** Kopi robusta (*Coffea canephora*) merupakan salah satu tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder salah satunya flavonoid. Selain menghilangkan rasa kantuk dan lelah, beberapa laporan penelitian menunjukkan bahwa kopi memiliki efek yang cukup baik bagi kesehatan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan validasi metode analisis pada penetapan kadar flavonoid total dari ekstrak biji kopi robusta menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

**Metode :** Desain penelitian ini adalah kuantitatif dengan menggunakan analisis hasil laboratorium. Ekstrak etanol biji kopi robusta dilakukan identifikasi senyawa flavonoid, pengukuran panjang gelombang, *operating time*, penentuan kurva baku dan konsentrasi optimum, uji validasi metode analisis dengan lima parameter meliputi spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, LOD dan LOQ, dan uji penetapan kadar flavonoid.

**Hasil Penelitian :** Ekstrak etanol biji kopi robusta pada penelitian ini mengandung senyawa flavonoid, panjang gelombang yang diperoleh yaitu 413 nm, *operating time* pada menit ke-20 sampai menit ke-30 dengan absorbansi 0,402, kurva baku diperoleh persamaan regresi  $y = 0,0056x + 0,0526$ , dan konsentrasi optimum standar 50 ppm dan sampel 50 ppm. Penelitian ini menghasilkan uji spesifisitas yang baik dimana uji linieritas dengan nilai korelasi  $r = 0,9934$  dan  $V_{xo} = 3,273225\%$ , uji akurasi memenuhi rentang 90%-107%, uji presisi  $RSD \geq 1,5\%$ , uji LOD = 8,376184 ppm dan LOQ = 27,92061 ppm. Penetapan kadar flavonoid total didapatkan  $19,935 \pm 0,1077$  mg/QE/g.

**Kesimpulan :** Validasi metode analisis telah memenuhi syarat validasi meliputi spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, LOD dan LOQ. Validasi metode dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar flavonoid dan didapatkan  $19,935 \pm 0,1077$  mg/QE/g.

**Kata Kunci :** Kopi Robusta, Flavonoid, Validasi Metode, Spektrofotometri UV-Vis

\*Peneliti

\*\*Pembimbing 1

\*\*\*Pembimbing 2

## ABSTRACT

Ilmiana, Rikza\*. Setyaningrum, Lindawati\*\*. Judi Susilo, Arief\*\*\*. **Validation of UV-Vis Spectrophotometric Analysis Method for Determination of Total Flavonoid Content Ethanol Extract of Robusta Coffee Beans (*Coffea canephora*)**. Essay. Pharmacy Undergraduate Study Program, University of dr. Soebandi.

---

**Introduction** : Robusta coffee (*Coffea canephora*) is a plant that contains secondary metabolites, one of which is flavonoids. Beside its effect to eliminate drowsiness and fatigue, several research has proven that coffe beans has a good effect in human's health. The purpose of this study was to validate the analytical method for determining the total flavonoid content of robusta coffee bean extract using UV-Vis spectrophotometry.

**Methods** : The design of this study was quantitative using laboratory analysis. ethanol extract of Robusta coffee bean were identified it's flavonoid compounds, measurement of wavelength, operating time, determination of standard curve and optimum concentration, validation test of analytical method with five parameters including specificity, linearity, accuracy, precision, LOD and LOQ, and flavonoid assay.

**Research results** : Robusta coffee bean ethanol extract in this study does contains flavonoid compounds, the wavelength obtained is 413 nm, optimum operating time is from 20 to 30 minutes with an absorbance of 0.402, the standard curve obtained is the regression equation  $y = 0.0056x + 0.0526$ , and the optimum concentration of the standard is 50 ppm and the sample is 50 ppm. This study resulted in a good specificity test where the linearity test with a correlation value of  $r = 0.9934$  and  $V_{xo} = 3.273225\%$ , the accuracy test met the range of 90%-107%, the RSD precision test was 1.5 %, the LOD test = 8, 376184 ppm and LOQ = 27.92061 ppm. The determination of total flavonoid levels was  $19.935 \pm 0.1077$  mg/QE/g.

**Conclusion** : Validation of the analytical method has met the validation requirements including specificity, linearity, accuracy, precision, LOD and LOQ. Validation of the method can be applied to the determination of flavonoid levels and obtained  $19.935 \pm 0.1077$  mg/QE/g.

**Keywords** : Robusta Coffee, Flavonoids, Method Validation, UV-Vis Spectrophotometry

\*Researcher

\*\*Advisor 1

\*\*\*Advisor 2

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, atas segala limpahan rahmat, taufik, dan Hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi yang berjudul “Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis Untuk Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)” dengan tepat waktu.

Penyusunan proposal ini dapat terlaksana dengan baik berkat bimbingan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Drs. Said Mardijanto, S.Kep., Ns., M.M., selaku Rektor Universitas dr. Soebandi
2. Ibu Hella Meldy Tursina, S.Kep., Ns., M.Kes., selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
3. Ibu apt. Dhina Ayu Susanti, S.Farm., M.Kes., selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi
4. Ibu apt. Sholihatil Hidayati, M.Farm., selaku Ketua Penguji
5. Ibu apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm., selaku Dosen Pembimbing Utama
6. Bapak Arief Judi Susilo, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Anggota
7. Bapak H. Fauzan dan Ibu Hj. Sri Wahyuni, selaku Orang Tua
8. Ns. Nadhifa, S. Kep. dan Zulfia Qotrunda, selaku saudara kandung

9. Muhammad Yazril Haryadi, selaku teman yang telah menemani dan membantu dalam proses penelitian
10. Semua pihak yang berjasa, serta pihak-pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan hidayahnya kepada kita dan semoga semua perbuatan kita mendapat ridho-Nya, semoga skripsi ini dapat menambah pengetahuan dan manfaat bagi perkembangan ilmu kefarmasian.

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

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

Jember, 28 September 2022

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERSETUJUAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBING SKRIPSI</b> .....	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xviii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	<b>xix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xx</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xxi</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
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.....	5
1.4 Manfaat .....	5
1.4.1 Bagi Peneliti .....	5
1.4.2 Bagi Peneliti Lain .....	5
1.4.3 Bagi Masyarakat .....	5
1.4.4 Bagi Ilmu Pengetahuan.....	5
1.5 Keaslian Penelitian.....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>7</b>
2.1 Tanaman Kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> ) .....	7

2.1.1	Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> ) .....	7
2.1.2	Morfologi Tanaman Kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> ) .....	8
2.1.3	Kandungan dan Manfaat Biji Kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> ) .	12
2.2	Ekstraksi.....	13
2.2.1	Definisi Ekstraksi .....	13
2.2.2	Tujuan Ekstraksi .....	14
2.2.3	Jenis-jenis Ekstraksi .....	15
2.3	Maserasi .....	19
2.3.1	Pengertian Maserasi.....	19
2.3.2	Prinsip Kerja Maserasi .....	20
2.3.3	Cara Kerja Maserasi .....	21
2.4	Etanol .....	22
2.5	Flavonoid .....	22
2.6	Spektrofotometri UV-Vis.....	27
2.6.1	Definisi Spektrofotometri UV-Vis .....	27
2.6.2	Bagian-bagian Spektrofotometri UV-Vis.....	28
2.6.3	Prinsip Kerja Spektrofotometri UV-Vis.....	29
2.7	Validasi Metode Analisis .....	30
2.7.1	Presisi .....	32
2.7.2	Akurasi .....	33
2.7.3	<i>Limit Of Detection</i> (LOD) dan <i>Limit Of Quantification</i> (LOQ)....	35
2.7.4	Spesifisitas .....	37
2.7.5	Linearitas .....	38
2.7.6	Ketangguhan/Kekasaran ( <i>ruggedness</i> ).....	39
2.7.7	Kekuatan/Ketahanan ( <i>Robustness</i> ).....	41
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP.....</b>		<b>43</b>
3.1	Kerangka Konsep.....	43
3.2	Hipotesis .....	44
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>		<b>45</b>
4.1	Desain Penelitian .....	45
4.2	Populasi dan Sampel.....	45
4.2.1	Populasi .....	45

4.2.2 Sampel .....	45
4.3 Variabel Penelitian.....	45
4.3.1 Variabel Bebas (Independent variable) .....	46
4.3.2 Variabel Terikat (Dependent variable).....	46
4.4 Tempat Penelitian .....	46
4.5 Waktu Penelitian.....	46
4.6 Definisi Operasional .....	47
4.7 Teknik Pengumpulan Data.....	49
4.7.1 Preparasi Sampel .....	49
4.7.2 Skrining Fitokimia Flavonoid.....	49
4.7.3 Preparasi Larutan Sampel dan Standar.....	50
4.7.4 Optimasi Metode Analisis .....	50
4.7.5 Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis .....	52
4.7.6 Penetapan Kadar Flavonoid Total Biji Kopi Robusta .....	54
4.8 Teknik Analisis Data.....	54
4.9 SOP (Standar Operasional Prosedur).....	55
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>56</b>
5.1 Determinasi Tanaman .....	56
5.2 Ekstraksi Biji Kopi Robusta.....	56
5.3 Skrining Fitokimia Flavonoid .....	56
5.4 Optimasi Metode Analisis.....	57
5.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	57
5.4.2 Penentuan <i>Operating Time</i> .....	57
5.4.3 Penentuan Kurva Baku Linier .....	58
5.4.4 Penentuan Konsentrasi Optimum .....	58
5.5 Validasi Metode Analisis .....	59
5.4.1 Linieritas.....	59
5.4.2 LOD & LOQ.....	59
5.4.3 Spesifisitas .....	60
5.4.4 Akurasi .....	62
5.4.5 Presisi .....	63
5.6 Penetapan Kadar Flavonoid Total Biji Kopi Robusta.....	64

<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>65</b>
6.1 Skrining Fitokimia Flavonoid .....	65
6.2 Optimasi Metode Analisis.....	65
6.2.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	65
6.2.2 Penentuan <i>Operating Time</i> .....	66
6.2.3 Penentuan Kurva Baku Linier .....	66
6.2.4 Penentuan Konsentrasi Optimum .....	67
6.3 Validasi Metode Analisis .....	67
6.3.1 Linieritas.....	67
6.3.2 LOD & LOQ.....	68
6.3.3 Spesifisitas .....	69
6.3.4 Akurasi .....	69
6.3.5 Presisi .....	70
6.4 Penetapan Kadar Flavonoid Total Biji Kopi Robusta.....	71
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>74</b>
7.1 Kesimpulan .....	74
7.2 Saran .....	74
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>75</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>80</b>

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 1.1 Keaslian Penelitian.....	6
Tabel 4.1 Definisi Operasional .....	47
Tabel 4.2 SOP (Standar Operasional Prosedur).....	55
Tabel 5.1 Hasil Skrining Fitokimia Flavonoid.....	56
Tabel 5.2 Penentuan <i>Operating Time</i> .....	58
Tabel 5.3 Penentuan Konsentrasi Optimum.....	58
Tabel 5.4 LOD & LOQ .....	60
Tabel 5.5 Akurasi .....	62
Tabel 5.6 Presisi .....	63
Tabel 5.7 Penetapan Kadar .....	64

## DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
CV	: <i>Coefficient Variation</i>
DNA	: <i>deoxyribonucle acid</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ISO	: Informasi Sistem Obat
LOD	: <i>Limit Of Detection</i>
LOQ	: <i>Limit Of Quantification</i>
mg	: miligram
mL	: mililiter
nm	: nanometer
pH	: <i>Potential Hydrogen</i>
ppb	: <i>Part Per Billion</i>
ppm	: <i>Part Per Million</i>
PUSLITKOKA	: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao
RSD	: <i>Relative Standard Deviasi</i>
UV	: Ultra Violet
Vis	: Visible

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Tanaman Kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> ) .....	7
Gambar 2.2 Struktur Dasar Senyawa Flavonoid.....	25
Gambar 2.3 Bagian-bagian Instrument Spektrofotometri UV-Vis .....	28
Gambar 3.1 Kerangka Konsep .....	43
Gambar 5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum .....	57
Gambar 5.2 Penentuan Operating Time .....	57
Gambar 5.3 Penentuan Kurva Baku Linier .....	58
Gambar 5.4 Linieritas.....	59
Gambar 5.5 Spektra Standar $\lambda$ 413 nm .....	61
Gambar 5.6 Spektra Sampel $\lambda$ 412 nm.....	61
Gambar 6.1 Pembentukan Senyawa Kompleks Kuersetin dan $AlCl_3$ .....	71

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Hasil Determinasi Biji Kopi Robusta .....	80
Lampiran 2. Rendemen Ekstrak Etanol 70% Biji Kopi Robusta .....	81
Lampiran 3. Hasil Skrining Fitokimia Flavonoid .....	82
Lampiran 4. Pengenceran Optimasi Metode Analisis .....	83
Lampiran 5. Perhitungan Validasi Metode Analisis .....	86
Lampiran 6. Perhitungan Kadar Flavonoid Total .....	94
Lampiran 7. Daftar Riwayat Hidup .....	96
Lampiran 8. Lembar Konsultasi Proposal Skripsi .....	97
Lampiran 9. Lembar Konsultasi Skripsi .....	100

## **BAB 1 PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Indonesia merupakan negara yang memiliki kekayaan alam yang cukup melimpah dan dikenal sebagai negara agraris. Salah satu wilayah Indonesia yang memiliki kekayaan alam yang cukup melimpah yaitu Kabupaten Jember. Kabupaten Jember merupakan wilayah kabupaten dan bagian dari Provinsi Jawa Timur dengan 31 kecamatan di dalamnya. Kabupaten Jember memiliki beberapa jenis komoditas yang berkembang, diantaranya komoditas tanaman pangan, hortikultura, perkebunan, perikanan, peternakan, dan pertanian. Komoditas perkebunan yang terdapat di Kabupaten Jember terdiri dari 14 komoditas yang terdiri dari kopi, kakao, tembakau (terdiri dari tembakau Na Oogst, tembakau *white burley*, tembakau kasturi, dan tembakau rajang), cengkeh, pinang, karet, lada, kapuk randu, vanili, jambu mete, dan kelapa (Sholihah *et al.*, 2015).

Kopi merupakan tanaman perkebunan yang sudah lama dibudidayakan dan mampu menjadi sumber nafkah bagi lebih dari satu setengah jiwa petani kopi Indonesia (Rahardjo, 2012). Kopi adalah salah satu komoditas unggulan di Kabupaten Jember. Lembaga riset yang mengembangkan kopi di Kabupaten Jember yaitu Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia (Puslitkoka). Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia (Puslitkoka) merupakan lembaga riset dan pengembangan kopi dan kakao nasional berdasarkan Surat Keputusan Menteri Pertanian No.786/Kpts/Org/9/1981 yang didirikan sejak 1 Januari 1911 pada masa kolonial Belanda. Jenis kopi yang banyak diusahakan di Kabupaten Jember adalah jenis kopi robusta (Sholihah *et al.*, 2015).

Salah salah satu hal yang menarik dari kopi, hingga saat ini mayoritas masyarakat hanya mengetahui khasiat utama kopi untuk menghilangkan rasa kantuk dan lelah. Hal ini dikarenakan terdapat kafein yang terkandung dalam kopi mampu merangsang sistem saraf pusat, sehingga kita bisa berpikir cemerlang, tidak mengantuk, dan konsentrasi kita terjaga (Rasyid, 2013). Selain menghilangkan rasa kantuk dan lelah, beberapa laporan penelitian menunjukkan bahwa kopi memiliki efek yang cukup baik bagi kesehatan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Beksono (2014) mengenai uji aktivitas antioksidan pada ekstrak biji kopi robusta, hasil uji menunjukkan bahwa biji kopi robusta memiliki efek antioksidan demikian juga penelitian yang dilakukan oleh Murtafiah (2012) mengenai daya hambat ekstrak biji kopi robusta terhadap *Streptococcus mutans*, hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak biji kopi robusta mempunyai daya hambat terhadap *Streptococcus mutans*.

Skrining fitokimia yang dilakukan oleh Nada *et al* (2021) menunjukkan bahwa biji sangrai kopi robusta mengandung golongan senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid, dan saponin. Dalam penelitian ini, dilakukan analisis untuk menetapkan kuantitas flavonoid total yang diperoleh cukup akurat, dimana angka yang terbaca langsung dicatat oleh detektor dan tercetak dalam bentuk angka digital ataupun grafik yang sudah diregresikan. Spektrofotometri UV-Vis digunakan dalam mengukur serapan yang dihasilkan dari interaksi kimia antara radiasi elektromagnetik dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia pada daerah UV-Vis (FI Edisi IV, 1995). Prinsip dari spektrofotometri UV-Vis adalah mengukur jumlah cahaya yang diabsorpsi atau ditransmisikan oleh molekul-

molekul di dalam larutan. Ketika panjang gelombang cahaya ditransmisikan melalui larutan, sebagian energi cahaya tersebut akan diserap (diabsorpsi).

Spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk penetapan kadar flavonoid karena flavonoid memiliki sistem karbonil yang terkonjugasi dengan cincin aromatic sehingga karakterisasi flavonoid dapat dilakukan dengan spektrofotometri (Frida, 2018). Oleh karena itu, spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk menentukan kadar flavonoid total, dimana larutan standar yang digunakan adalah kuersetin. Kuersetin digunakan sebagai larutan standar karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keton pada C-4 dan memiliki gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol (Kumalasari *et al.*, 2018). Dalam melakukan analisis kadar flavonoid total, sebelum melakukan validasi metode analisis terlebih dahulu dilakukan optimasi.

Optimasi merupakan suatu proses penguraian data-data awal dengan menggunakan suatu metode sebelumnya (Misdram & Cahyono, 2021). Dilakukan optimasi dengan penentuan *operating time* (OT), penentuan panjang gelombang maksimum, penentuan kurva baku linier dan penentuan konsentrasi optimum. Setelah melakukan optimasi, dilanjut dengan validasi metode analisis.

Suatu metode dalam penelitian perlu dilakukan validasi karena tempat, waktu, dan sampel yang digunakan dalam penelitian berbeda dengan yang sudah dilakukan penelitian lain. Selain itu, penelitian ini dikerjakan oleh analis yang berbeda dan alat yang berbeda pula sehingga validasi diperlukan untuk menjamin mutu dari suatu metode. Validasi ini juga bertujuan untuk memastikan bahwa metode yang akan digunakan telah memenuhi persyaratan untuk aplikasi analisis

dan dapat dipertanggungjawabkan kebenarannya (Rohmah *et al.*, 2021). Parameter validasi metode analisis yang digunakan seperti akurasi, presisi, spesifisitas, limit deteksi, limit kuantitasi, dan linieritas.

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode analisis untuk penetapan kadar flavonoid total pada biji kopi robusta menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana identifikasi kandungan senyawa flavonoid dari ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*)?
2. Bagaimana optimasi dan validasi metode analisis spektrofotometri UV-Vis untuk penetapan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*)?
3. Berapa kadar flavonoid pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) secara spektrofotometri UV-Vis?

## **1.3 Tujuan**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Untuk mengetahui kadar flavonoid total dalam biji kopi robusta yang dilakukan dengan metode Spektrofotometri UV-Vis yang telah memenuhi persyaratan validasi metode analisis seperti akurasi, presisi, spesifisitas, limit deteksi, limit kuantitasi, dan linieritas.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Untuk mengidentifikasi kandungan senyawa flavonoid dari ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*).
2. Untuk mengetahui optimasi dan validasi metode analisis spektrofotometri UV-Vis untuk penetapan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*).
3. Untuk menganalisa kadar flavonoid total pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) secara Spektrofotometri UV-Vis.

## **1.4 Manfaat**

### **1.4.1 Bagi Peneliti**

Memberikan informasi terkait identifikasi, optimasi, dan validasi metode analisis penetapan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*).

### **1.4.2 Bagi Peneliti Lain**

Memberikan pengetahuan tentang identifikasi, optimasi, dan validasi metode analisis yang lebih tepat, mudah dan sederhana.

### **1.4.3 Bagi Masyarakat**

Memberikan informasi kadar flavonoid total pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*).

### **1.4.4 Bagi Ilmu Pengetahuan**

Memberikan informasi yang dapat menjadi sumber data ilmiah atau rujukan bagi peneliti lanjutan, penelitian lainnya dan mahasiswa tentang kadar flavonoid

total pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.

### 1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

Peneliti	Persamaan	Perbedaan
Afrida Yeti dan Rafita Yuniarti (2021)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Penetapan kadar flavonoid total</li> <li>– Menggunakan ekstraksi maserasi</li> <li>– Menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis</li> <li>– Menggunakan standar kuersetin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Menggunakan herba rumput bambu</li> <li>– Menggunakan etanol 96%</li> </ul>
Aminah, Nurhayati Tomayahu, dan Zainal Abidin (2017)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Penetapan kadar flavonoid total</li> <li>– Menggunakan ekstraksi maserasi</li> <li>– Menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis</li> <li>– Menggunakan standar kuersetin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Menggunakan kulit buah alpukat</li> <li>– Menggunakan etanol 96%</li> </ul>
Eka Kumalasari, M. Ahlun Nazir, dan Aditya Maulana Perdana Putra (2018)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Penetapan kadar flavonoid total</li> <li>– Menggunakan ekstraksi maserasi</li> <li>– Menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis</li> <li>– Menggunakan etanol 70%</li> <li>– Menggunakan standar kuersetin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Menggunakan bawang dayak</li> </ul>

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

#### 2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)



Gambar 2.1 Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kopi Robusta atau yang disebut dengan (*Coffea canephora*, Pierre) termasuk dalam kelas *Dicotyledoneae* (*Magnoliopsida*) dan bergenus *Coffea* dari famili *Rubiaceae*. Jenis kopi ini memiliki akar tunggang yang tumbuh tegak lurus sedalam hampir 45 cm dengan warna kuning muda. Batang dan cabang-cabang kopi robusta dapat tumbuh hingga mencapai ketinggian 2-4 meter dari permukaan tanah atau mungkin juga lebih, tergantung varietas dan didaerah mana kopi tersebut tumbuh. Kopi Robusta tumbuh optimal di ketinggian 400-700 m dpl dengan temperatur 21-24°C dan bulan kering 3-4 bulan secara berturut-turut.

Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta:

Kingdom/ Regnum : Plantae

Divisio : Spermatophyta

Sub Divisio : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida (Dicotyledoneae)

Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Rubiales
Famili	: <i>Rubiaceae</i>
Genus	: <i>Coffea</i>
Spesies	: <i>Coffea canephora</i> , Pierre

### **2.1.2 Morfologi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)**

#### **a. Daun**

Daun kopi robusta termasuk daun tidak lengkap karena hanya mempunyai tangkai daun (*petiolus*), helaian daun (*lamina*). Daun berbentuk (Bangun daun) jorong dengan ujung daun meruncing serta pangkal daun membulat Susunan tulang daun menyirip, tepi daun rata dan permukaan daun berombak bersifat licin mengkilat. Warna daun hijau dan rata-rata mempunyai ukuran lebar berkisar 10- 16 cm dan panjang daun berkisar 20-30 cm dengan tangkai daun panjang antara 0,5-1 cm. Tergolong dalam daun tunggal karena dalam satu tangkai terdapat satu daun dengan kedudukan bersilang berhadapan. Tetapi ciri-ciri daun bisa berbeda tergantung dari varietas tanaman.

#### **b. Batang**

Morfologi batang tanaman kopi tegak lurus ke atas dan beruas-ruas hampir pada setiap ruas tumbuh kuncup-kuncup pada batang dan cabang. Pada susunan batang-batang tersebut, sering tumbuh cabang yang tegak lurus (*orthotrop*), dan bila dibiarkan bisa mencapai tinggi 4 meter, jika tidak dipotong ujungnya bisa lebih tinggi lagi. Tanaman kopi memiliki sistem percabangan yang berbeda dengan tanaman lain. Cabang-cabang pada tanaman kopi diantaranya:

1. Cabang reproduksi (orthotrop) adalah cabang yang tumbuhnya tegak lurus, cabang ini berasal dari tunas reproduksi yang terletak disetiap ketiak daun pada batang utama (primer). Pada setiap ketiak daun mempunyai 4-5 tunas reproduksi.
2. Cabang utama (plagiotrop) adalah cabang yang tumbuh pada batang utama atau cabang reproduksi dan berasal dari cabang primer Pada setiap ketiak daun hanya mempunyai satu tunas utama, sehingga jika cabang ini mati maka di tempat itu sudah tidak dapat tumbuh cabang utama lagi Cabang ini berfungsi sebagai penghasil bunga karena disetiap ketiak daunnya terdapat mata tunas yang dapat tumbuh menjadi bunga. Arah tumbuh cabang ini terkulai (*declinatus*).
3. Cabang sekunder adalah cabang yang tumbuh pada cabang primer dan berasal dari tunas sekunder. Cabang ini bersifat seperti cabang utama dapat menghasilkan bunga.
4. Cabang kipas adalah cabang reproduksi yang tumbuh kuat pada cabang utama karena pohon sudah tua. Cabang reproduksi ini sifatnya sama seperti batang utama dan sering disebut sebagai cabang kipas.
5. Cabang pecut adalah cabang kipas yang tidak mampu membentuk cabang utama, meskipun tumbuhnya cukup kuat.
6. Cabang balik adalah cabang reproduksi yang tumbuh pada cabang utama, berkembang tidak normal dan mempunyai arah pertumbuhan menuju kedalam mahkota tajuk.

7. Cabang air atau tunas air merupakan cabang reproduksi yang mempunyai ruas-ruas daun panjang dan lunak serta banyak mengandung air.

Batang dari pohon kopi robusta tingginya dapat mencapai 2-4 meter, akan tetapi jika tidak dipotong atau dipangkas ujungnya bisa lebih tinggi lagi.

c. Akar

Secara alami tanaman kopi memiliki akar tunggang sehingga tidak mudah rebah. Tetapi akar tunggang tersebut hanya dimiliki oleh tanaman kopi dengan perbanyakan secara generatif menggunakan biji semai atau perbanyakan vegetatif sambungan (okulasi) yang batang bawahnya berasal dari persemaian biji kopi. Tanaman kopi yang bibitnya berasal dari perbanyakan secara vegetatif (bibit stek) dengan batang bawahnya merupakan stek batang atau cabang maka tidak memiliki akar tunggang sehingga relatif mudah rebah.

Panjang akar tunggang dapat mencapai 45-50 cm, dan terdapat 4-8 akar ke arah samping yang tumbuh menurun kebawah sepanjang antara 2-3 m, selain itu banyak akar cabang samping yang panjangnya dapat mencapai 1-2 m ke arah samping (horizontal) sedalam kurang lebih 30 cm, pada akar ini akan memunculkan rambut-rambut akar yang berguna untuk memperluas area penyerapan air dan nutrisi untuk tanaman, sedangkan tudung akar berfungsi untuk melindungi akar ketika menyerap unsur hara dari tanah.

d. Bunga

Tanaman kopi termasuk ke dalam jenis (*planta multiflora*) karena mampu menghasilkan bunga banyak. Letak bunga kopi ada pada ketiak daun (*flos axillaris*) dengan bunga yang membentuk suatu rangkaian bergerombol. Suatu rangkaian

tersebut dinamakan bunga majemuk. Tanaman kopi termasuk golongan berumah satu (*monoceus*) artinya bunga jantan dan betina ada pada satu tanaman. Meskipun demikian tanaman kopi robusta kebanyakan melakukan penyerbukan silang (*cross pollination*). Jumlah kuncup bunga pada setiap ketiak daun terbatas, sehingga setiap ketiak daun yang sudah menghasilkan bunga dengan jumlah tertentu tidak akan pernah menghasilkan bunga lagi. Namun demikian cabang utama (plagiotrop) dapat terus tumbuh memanjang membentuk daun baru, batang pun dapat terus menghasilkan cabang utama sehingga bunga bisa terus dihasilkan oleh tanaman. Tanaman kopi yang sudah cukup dewasa dan dipelihara dengan baik dapat menghasilkan ribuan bunga dalam satu saat. Bunga tersebut tersusun dalam kelompok yang masing-masing terdiri dari 3-5 kuntum bunga. Pada setiap ketiak daun dapat menghasilkan 8-18 kuntum bunga, atau setiap buku menghasilkan 16-36 kuntum bunga. Bunga tanaman kopi berukuran kecil, mahkotanya berwarna putih dan berbau harum semerbak. Kelopak bunga berwarna hijau, pangkalnya menutupi bakal buah yang mengandung dua bakal biji. Benangsarinya terdiri dari 5-7 tangkai yang berukuran pendek. Setelah terjadi penyerbukan mula-mula mahkota bunga tampak mengering dan berguguran, kemudian kulit buah yang berwarna hijau makin lama makin membesar bila sudah tua kulit ini akan berubah menguning dan akhirnya menjadi merah tua. Waktu yang diperlukan kopi robusta sejak terbentuknya bunga hingga buah menjadi matang berkisar 8-10 bulan. Bunga tanaman kopi biasanya akan mekar pada permulaan musim kemarau sehingga pada akhir musim kemarau telah berkembang menjadi buah yang siap dipetik. Pada

awal hujan, cabang primer akan memanjang dan membentuk daun-daun baru yang siap mengeluarkan bunga pada awal musim kemarau mendatang.

e. Buah dan Biji

Setelah tanaman kopi melakukan penyerbukan akan dihasilkan buah dan biji. Buah kopi muda berwarna hijau muda, berubah menjadi hijau tua lalu menguning dan setelah matang akan berwarna merah atau merah tua. Ukuran buah kopi robusta berkisar 15-18 mm. Daging buah kopi yang sudah matang sempurna mengandung lendir dan senyawa glukosa yang rasanya manis. Tanaman kopi termasuk golongan tumbuhan angiospermae, yaitu tumbuhan dengan biji tertutup dan kelas magnoliopsida (dikotil) tumbuhan yang memiliki dua keping biji atau berkendaga dua. Buah kopi memang pada umumnya mengandung dua butir biji, tetapi kadang-kadang juga terjadi penyimpangan dengan menghasilkan satu butir biji. Daging buah kopi robusta terdiri atas tiga bagian, yaitu lapisan kulit luar (*eksokarp*), lapisan tengah atau daging buah (*mesokarp*), dan lapisan kulit tanduk (*endokarp*) yang tipis tetapi keras. Biji kopi terdiri dari kulit biji dan lembaga. Lembaga atau sering disebut endosperm merupakan bagian penyimpan cadangan makanan biji kopi dan dapat dimanfaatkan sebagai bahan untuk membuat minuman kopi.

### **2.1.3 Kandungan dan Manfaat Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)**

Pada penelitian Wigati *et al* (2018) menunjukkan bahwa kopi robusta mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kafein dan fenol. Pada penelitian Wulandari *et al* (2019) biji kopi memiliki kandungan senyawa polifenol sebesar 0,2% yang bermanfaat sebagai antioksidan untuk kesehatan kulit wajah. Biji kopi sangat baik untuk mengangkat sel-sel kulit mati, melembabkan dan

melembutkan kulit. Suranny dan Wagino (2019) menambahkan, masker dari kopi sangat banyak manfaat untuk bagi kulit antara lain: mengatasi komedo, mengecilkan pori, mengontrol minyak berlebihan, menghilangkan jerawat, mengencangkan kulit dan menghilangkan flek hitam pada wajah.

Pada penelitian Yuliana *et al* (2021) flavonoid yang terdapat pada ampas seduhan kopi memiliki aktivitas antioksidan yaitu mengandung antioksidan sebesar 3,88% dan kafein yang terkandung di dalam ampas kopi sejumlah 1-1,5% dapat bertindak selaku Vasorestrictor yang berarti mengencangkan dan mengecilkan pembuluh darah. Kafein memiliki efek menstimulasi sistem saraf pusat sebagai antagonis reseptor adenosine (Pertiwi, 2015).

## **2.2 Ekstraksi**

### **2.2.1 Definisi Ekstraksi**

Beberapa definisi mengenai ekstraksi menurut Marjoni (2016) adalah sebagai berikut:

1. Ekstraksi adalah suatu proses penyarian zat aktif dari bagian tanaman obat yang bertujuan untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bagian tanaman obat tersebut.
2. Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campuran dengan menggunakan pelarut tertentu.
3. Ekstraksi adalah suatu cara untuk memperoleh sediaan yang mengandung senyawa aktif dari suatu bahan alam menggunakan pelarut yang sesuai.
4. Ekstraksi merupakan suatu prose penarikan senyawa tumbuh-tumbuhan, hewan, dan lain-lain menggunakan pelarut tertentu.

Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode dan cara yang sesuai dengan sifat dan tujuan ekstraksi itu sendiri. Sampel yang akan diekstraksi dapat berbentuk sampel segar ataupun sampel yang telah dikeringkan. Sampel yang umum digunakan adalah sampel segar karena penetrasi pelarut akan berlangsung lebih cepat. Selain itu penggunaan sampel segar dapat mengurangi kemungkinan terbentuknya polimer resin atau artefak lain yang dapat terbentuk selama proses pengeringan. Penggunaan sampel kering juga memiliki kelebihan yaitu dapat mengurangi kadar air yang terdapat di dalam sampel, sehingga dapat mencegah kemungkinan rusaknya senyawa akibat aktivitas antimikroba (Marjoni, 2016).

### **2.2.2 Tujuan Ekstraksi**

Tujuan dari ekstraksi adalah untuk menarik semua zat aktif dan komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Menurut Marjoni (2016) dalam menentukan tujuan dari suatu proses ekstraksi, perlu diperhatikan beberapa kondisi dan pertimbangan berikut ini:

1. Senyawa kimia yang telah memiliki identitas

Untuk senyawa kimia yang telah memiliki identitas, maka proses ekstraksi dapat dilakukan dengan cara mengikuti prosedur yang telah dipublikasikan atau dapat juga dilakukan sedikit modifikasi untuk mengembangkan proses ekstraksi.

2. Mengandung kelompok senyawa kimia tertentu

Dalam hal ini, proses ekstraksi bertujuan untuk menemukan kelompok senyawa kimia metabolit sekunder tertentu dalam simplisia seperti alkaloid, flavonoid, dan lain-lain. Metode umum yang dapat digunakan adalah studi pustaka

dan untuk kepastian hasil yang diperoleh, ekstrak diuji lebih lanjut secara kimia atau analisa kromatografi yang sesuai untuk kelompok senyawa yang dituju.

### 3. Organisme (tanaman atau hewan)

Penggunaan simplisia dalam pengobatan tradisional biasanya dibuat dengan cara mendidihkan atau menyeduh simplisia tersebut dalam air. Dalam hal ini, proses ekstraksi yang dilakukan secara tradisional tersebut harus ditiru dan di kerjakan sedekat mungkin, apalagi jika ekstrak tersebut akan dilakukan kajian ilmiah lebih lanjut terutama dalam hal validasi penggunaan obat tradisional.

### 4. Penemuan senyawa baru

Untuk isolasi senyawa kimia baru yang belum diketahui sifatnya dan belum pernah ditentukan sebelumnya dengan metode apapun maka, metode ekstraksi dapat dipilih secara random atau dapat juga dipilih berdasarkan penggunaan tradisional untuk mengetahui adanya senyawa kimia yang memiliki aktivitas biologi khusus.

## **2.2.3 Jenis-jenis Ekstraksi**

Menurut Marjoni (2016) ekstraksi dibagi menjadi beberapa jenis, yaitu sebagai berikut:

### 1. Berdasarkan bentuk substansi dalam campuran

#### a. Ekstraksi padat-cair

Proses ekstraksi padat-cair ini merupakan proses ekstraksi yang paling banyak ditemukan dalam mengisolasi suatu substansi yang terkandung di dalam suatu bahan alam. Proses ini melibatkan substansi yang berbentuk padat di dalam campurannya dan memerlukan kontak yang sangat lama antara pelarut dan zat

padat. Kesempurnaan proses ekstraksi sangat ditentukan oleh sifat dari bahan alam dan sifat dari bahan yang akan diekstraksi.

b. Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi ini dilakukan apabila substansi yang akan diekstraksi berbentuk cairan di dalam campurannya.

2. Berdasarkan penggunaan panas

a. Ekstraksi secara dingin

Metode ekstraksi secara dingin bertujuan untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang terdapat dalam simplisia yang tidak tahan terhadap panas atau bersifat thermolabil. Ekstraksi secara dingin dapat dilakukan dengan beberapa cara berikut ini :

1) Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi sederhana yang dilakukan hanya dengan cara merendam simplisia dalam satu atau campuran pelarut selama waktu tertentu pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya.

2) Perkolasi

Perkolasi adalah proses penyarian zat aktif secara dingin dengan cara mengalirkan pelarut secara kontinu pada simplisia selama waktu tertentu.

b. Ekstraksi secara panas

Metode panas digunakan apabila senyawa-senyawa yang terkandung dalam simplisia sudah dipastikan tahan panas. Metode ekstraksi yang membutuhkan diantaranya :

1) Seduhan

Merupakan metode ekstraksi paling sederhana hanya dengan merendam simplisia dengan air panas selama waktu tertentu (5-10 menit).

2) Coque (penggodokan)

Merupakan proses penyarian dengan cara menggodok simplisia menggunakan api langsung dan hasilnya dapat langsung digunakan sebagai obat baik secara keseluruhan termasuk ampasnya atau hanya hasil godokannya saja tanpa ampas.

3) Infusa

Infusa merupakan sediaan cair yang dibuat dengan cara menyari simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Kecuali dinyatakan lain, infusa dilakukan dengan cara sebagai berikut :

"Simplisia dengan derajat kehalusan tertentu dimasukkan ke dalam panci infusa, kemudian ditambahkan air secukupnya. Panaskan campuran di atas penangas air selama 15 menit, dihitung mulai suhu 90°C sambil sekali-sekali diaduk. Serkai selagi panas menggunakan kain flanel, tambahkan air panas secukupnya melalui ampas sehingga diperoleh volume infus yang dikehendaki".

4) Digestasi

Digestasi adalah proses ekstraksi yang cara kerjanya hampir sama dengan maserasi, hanya saja digesti menggunakan pemanasan rendah pada suhu 30-40°C. Metode ini biasanya digunakan untuk simplisia yang tersari baik pada suhu biasa.

#### 5) Dekokta

Proses penyarian secara dekokta hampir sama dengan infusa, perbedaannya hanya terletak pada lamanya waktu pemanasan. Waktu pemanasan pada dekokta lebih lama dibanding metode infusa, yaitu 30 menit dihitung setelah suhu mencapai 90°C. Metode ini sudah sangat jarang digunakan karena selain proses penyariannya yang kurang sempurna dan juga tidak dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil.

#### 6) Refluks

Refluks merupakan proses ekstraksi dengan pelarut pada titik didih pelarut selama waktu dan jumlah pelarut tertentu dengan adanya pendingin balik (kondensor). Proses ini umumnya dilakukan 3-5 kali pengulangan pada residu pertama, sehingga termasuk proses ekstraksi yang cukup sempurna.

#### 7) Soxhletasi

Proses soxhletasi merupakan proses ekstraksi panas menggunakan alat khusus berupa esktraktor soxhlet. Suhu yang digunakan lebih rendah dibandingkan dengan suhu pada metode refluks.

### 3. Berdasarkan metode ekstraksi

#### a. Ekstraksi tunggal

Merupakan proses ekstraksi dengan cara mencampurkan bahan yang akan diekstrak sebanyak satu kali dengan pelarut. Pada ekstraksi ini sebagian dari zat aktif akan terlarut dalam pelarut sampai mencapai suatu keseimbangan.

Kekurangan dari ekstraksi dengan cara seperti ini adalah rendahnya rendemen yang dihasilkan.

b. Ekstraksi multi tahap

Merupakan suatu proses ekstraksi dengan cara mencampurkan bahan yang akan diekstrak beberapa kali dengan pelarut yang baru dalam jumlah yang sama banyak. Ekstrak yang dihasilkan dengan cara ini memiliki rendemen lebih tinggi dibandingkan ekstraksi tunggal, karena bahan yang diekstrak mengalami beberapa kali pencampuran dan pemisahan.

## **2.3 Maserasi**

### **2.3.1 Pengertian Maserasi**

Beberapa definisi mengenai maserasi menurut Marjoni (2016) adalah sebagai berikut:

1. Maserasi berasal dari bahasa latin "*macerare*" yang berarti merendam, sehingga maserasi dapat diartikan sebagai suatu sediaan cair yang dibuat dengan cara merendam bahan nabati menggunakan pelarut bukan air atau pelarut setengah air seperti etanol encer selama waktu tertentu.
2. Maserasi merupakan suatu proses dimana obat yang sudah halus direndam dalam menstrum sampai meresap dan melunakan susunan sel, sehingga zat aktif dalam obat yang mudah larut akan melarut.
3. Maserasi merupakan merupakan salah satu cara ekstraksi yang sangat sederhana hanya dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dengan pelarut yang cocok dan tanpa pemanasan.

4. Maserasi adalah proses ekstraksi bahan dengan pelarut yang cocok pada suhu kamar selama waktu tertentu dengan sesekali diaduk/digojok.

Secara umum dapat disimpulkan bahwa maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam simplisia nabati menggunakan pelarut tertentu selama waktu tertentu dengan sesekali dilakukan pengadukan atau penggojokan.

### **2.3.2 Prinsip Kerja Maserasi**

Prinsip kerja dari maserasi adalah proses melarutnya zat aktif berdasarkan sifat kelarutannya dalam suatu pelarut (*like dissolved like*). Ekstraksi zat aktif dilakukan dengan cara merendam simplisia nabati dalam pelarut yang sesuai selama beberapa hari pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Pelarut yang digunakan, akan menembus dinding sel dan kemudian masuk ke dalam sel tanaman yang penuh dengan zat aktif. Pertemuan antara zat aktif dan pelarut akan mengakibatkan terjadinya proses pelarutan dimana zat aktif akan terlarut dalam pelarut. Pelarut yang berada didalam sel mengandung zat aktif sementara pelarut yang berada di luar sel belum terisi zat aktif, sehingga terjadi ketidakseimbangan antara konsentrasi zat aktif di dalam dengan konsentrasi zat aktif yang ada di luar sel. Perbedaan konsentrasi ini akan mengakibatkan terjadinya proses difusi, dimana larutan dengan konsentrasi tinggi akan terdesak keluar sel dan digantikan oleh pelarut dengan konsentrasi rendah. Peristiwa ini terjadi berulang-ulang sampai didapat suatu kesetimbangan konsentrasi larutan antara di dalam sel dengan konsentrasi larutan di luar sel.

### 2.3.3 Cara Kerja Maserasi

Maserasi biasanya dilakukan pada suhu antara 15-20 °C dalam waktu selama 3 hari sampai zat aktif yang dikehendaki larut. Kecuali dinyatakan lain, maserasi dilakukan dengan cara merendam 10 bagian simplisia atau campuran simplisia dengan derajat kehalusan tertentu, dimasukan ke dalam bejana kemudian dituangi dengan 70 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 3-5 hari pada tempat yang terlindung dari cahaya. Diaduk berulang-ulang, dikerai dan diperas. Ampas dari maserasi dicuci menggunakan cairan penyari secukupnya sampai diperoleh 100 bagian sari. Bejana ditutup dan dibiarkan selama 2 hari di tempat sejuk dan terlindung dari cahaya matahari kemudian pisahkan endapan yang diperoleh (Marjoni, 2016).

Maserasi merupakan metode sederhana dan paling banyak digunakan karena metode ini sesuai dan baik untuk skala kecil maupun skala industri. Langkah-langkah pengerjaan maserasi adalah sebagai berikut:

1. Simplisia dimasukan kedalam wadah yang bersifat inert dan tertutup rapat pada suhu kamar.
2. Simplisia kemudian direndam dengan pelarut yang cocok selama beberapa hari sambil sesekali diaduk. Pelarut yang digunakan untuk maserasi dapat bersifat “bisa campur air” seperti air itu sendiri yang disebut dengan pelarut polar dan dapat juga digunakan pelarut yang tidak dapat bercampur dengan air seperti: aseton, etil asetat. Pelarut yang dapat bercampur dengan air ini disebut pelarut non polar atau pelarut organik.

3. Setelah proses ekstraksi selesai, pelarut dipisahkan dan sampel dengan cara penyaringan.

Waktu maserasi pada umumnya adalah 5 hari, karena dengan waktu tersebut telah tercapai keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan luar sel. Pengocokan yang dilakukan selama maserasi akan menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi lebih cepat dalam cairan. Tanpa adanya pengocokan akan mengakibatkan berkurangnya perpindahan bahan aktif selama proses maserasi (Marjoni, 2016).

#### **2.4 Etanol**

Etanol adalah campuran etilalkohol dan air. Mengandung tidak kurang dari 94,7 v/v atau 92,0% dan tidak lebih dari 95,2% v/v atau 92,7%  $C_2H_6O$ . Etanol tidak berwarna, jernih, mudah menguap dan mudah bergerak; bau khas; rasa panas, mudah terbakar dengan memberikan nyala biru yang tidak berasap. Etanol sangat mudah larut dalam air, dalam *kloroform P* dan dalam *eter P* dan memiliki bobot jenis 0,8119 sampai 0,8139 (Farmakope Indonesia Edisi III hal 65, 1979).

#### **2.5 Flavonoid**

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder yang memiliki struktur inti  $C_6-C_3-C_6$  yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan dengan 3 atom C, biasanya dengan ikatan atom O yang berupa ikatan oksigen heterosiklik. Senyawa ini dapat dimasukkan sebagai senyawa polifenol karena mengandung dua atau lebih gugus hidroksil, bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Umumnya flavonoid ditemukan berikatan dengan gula membentuk glikosida yang menyebabkan senyawa ini lebih mudah larut dalam pelarut polar, seperti metanol, etanol, butanol,

etil asetat. Bentuk glikosida memiliki warna yang lebih pucat dibandingkan bentuk aglikon. Dalam bentuk aglikon, sifatnya kurang polar, cenderung lebih mudah larut dalam pelarut kloroform dan eter (Kristanti *et al.*, 2019).

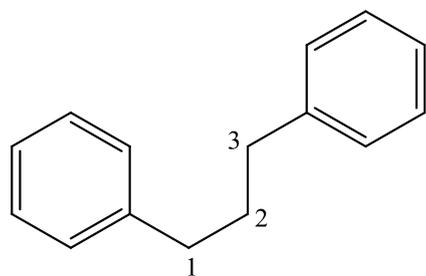
Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Banyaknya senyawa flavonoid ini bukan disebabkan karena banyaknya variasi struktur, akan tetapi lebih disebabkan oleh berbagai tingkat hidroksilasi, alkoksilasi atau glikosilasi pada struktur tersebut. Flavonoid di alam juga sering dijumpai dalam bentuk glikosidanya (Kristanti *et al.*, 2019).

Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru dan sebagian zat warna kuning yang terdapat dalam tanaman. Sebagai pigmen bunga, flavonoid jelas berperan dalam menarik serangga untuk membantu proses penyerbukan. Beberapa kemungkinan fungsi flavonoid yang lain bagi tumbuhan adalah sebagai zat pengatur tumbuh, pengatur proses fotosintesis, sebagai zat antimikroba, antivirus dan antiinsektisida. Beberapa flavonoid sengaja dihasilkan oleh jaringan tumbuhan sebagai respons terhadap infeksi atau luka yang kemudian berfungsi menghambat fungi penyerangnya (Kristanti *et al.*, 2019).

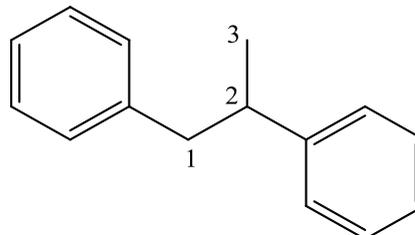
Telah banyak flavonoid yang diketahui memberikan efek fisiologis tertentu. Oleh karena itu, tumbuhan yang mengandung flavonoid banyak dipakai dalam pengobatan tradisional. Penelitian masih terus dilakukan untuk mengetahui berbagai manfaat yang bisa diperoleh dari senyawa flavonoid.

Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri atas 15 atom karbon yang membentuk susunan C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Susunan ini dapat menghasilkan tiga

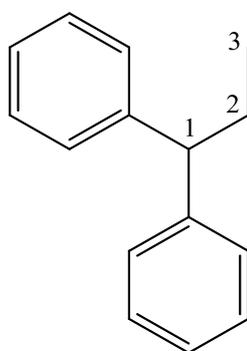
jenis struktur, yaitu 1,3-diarilpropan atau flavonoid, 1,2-diarilpropan atau isoflavonoid dan 1,1,-diarilpropan atau neoflavonoid.



Flavonoid

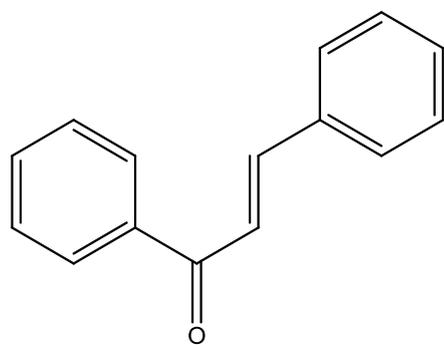


Isoflavonoid

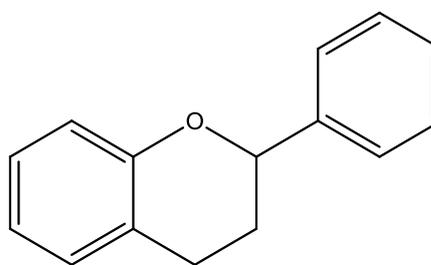


Neoflavonoid

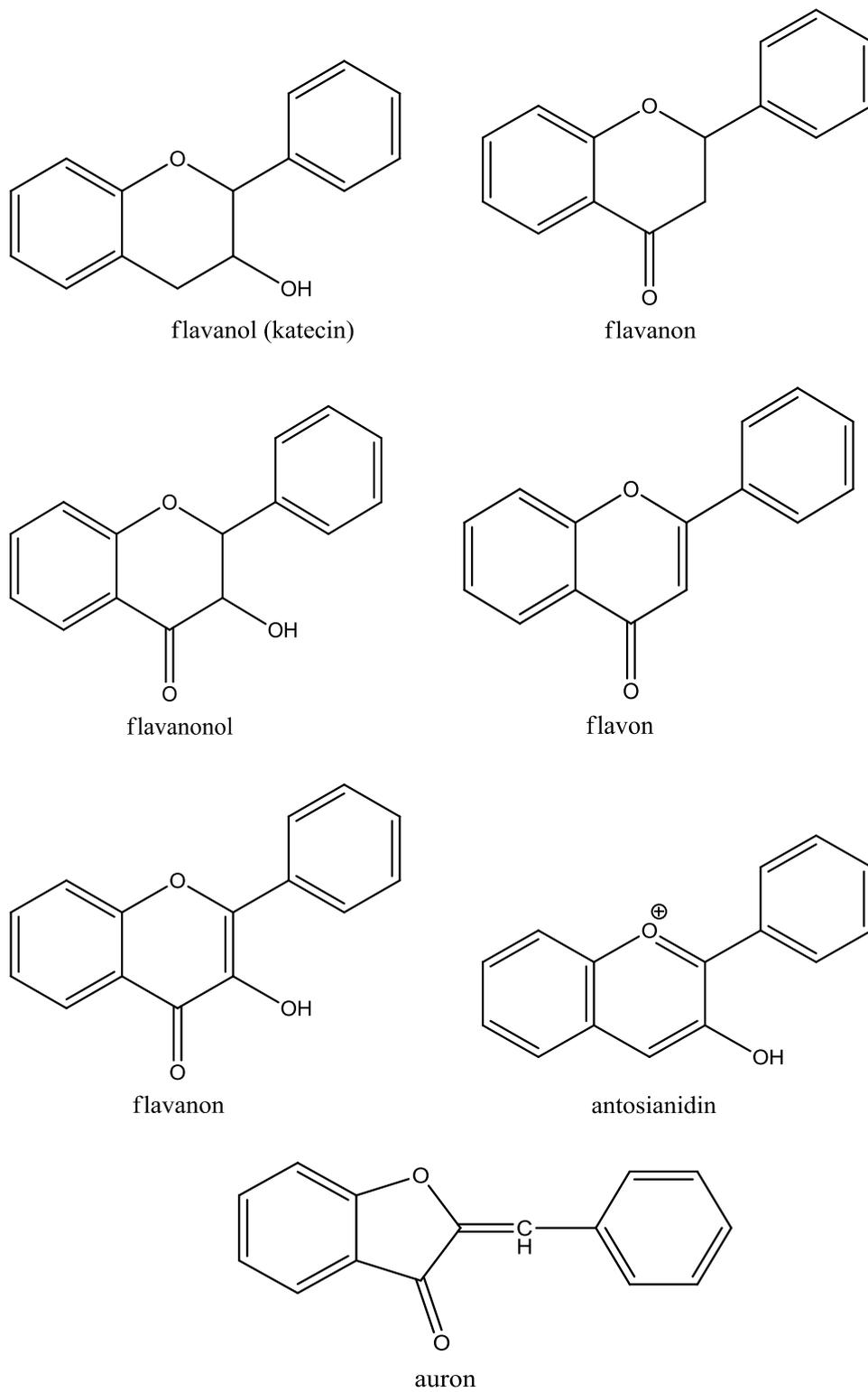
Dari struktur 1,3-diarilpropan, terdapat beberapa jenis flavonoid bergantung pada tingkat oksidasi rantai propan ( $C_3$ ), yaitu:



calkon



flavan



Gambar 1.2 Struktur Dasar Senyawa Flavonoid

Katecin, adalah senyawa yang mempunyai banyak kesamaan dengan proantosianidin. Dikenal tiga jenis katecin yang perbedaannya hanya pada jumlah gugus hidroksil pada cincin B (1, 2, atau 3). Pada katecin, atom H pada C-2 dan C-3 berposisi trans. Pada epikatecin, kedua atom H berposisi cis. Telah ditemukan epikatecin glikosida dan ester katecin dengan asam galat. Katecin juga dijumpai dalam bentuk oligomer.

Proantosianidin dipilah ke dalam tiga kelompok.

- Leukoantosianidin klasik adalah flavan-3,4-diol atau flavan-4-ol. Leukoantosianidin jarang terdapat sebagai glikosida.
- Suatu dimer yang tersusun atas katecin dan antosianidin. Dimer ini ada yang dihubungkan dengan ikatan eter 2-7 dan ikatan karbon-karbon 4-8' atau 4-6' dan ada yang hanya dihubungkan dengan ikatan karbon-karbon.
- Polimer terdiri dari monomer flavonoid saja dan polimer yang tersusun atas monomer flavonoid glikosida.

Proantosianidin, menurut definisi, adalah senyawa yang membentuk antosianidin (jika dipanaskan dengan asam). Jika proantosianidin diperlakukan dengan asam dingin akan menghasilkan polimer yang menyerupai tanin.

Flavanon (dihidroflavon) dan Flavanonol (dihidroflavonol) tersebar di alam dalam jumlah yang terbatas. Keduanya merupakan senyawa tidak berwarna atau sedikit kuning. Flavon dan Flavonol merupakan flavonoid utama karena termasuk jenis flavonoid yang banyak dijumpai di alam.

Antosianidin, merupakan flavonoid utama karena termasuk jenis flavonoid yang banyak dijumpai di alam, terutama dalam bentuk glikosidanya, yang

dinamakan antosianin. Antosianin adalah pigmen daun dan bunga dari yang berwarna merah hingga biru. Pada  $\text{pH} < 2$ , antosianin berada dalam bentuk kation (ion flavilium), tetapi pada pH yang sedikit asam, bentuk kuinonoid yang terbentuk. Bentuk ini dioksidasi dengan cepat oleh udara dan rusak, oleh karena itu pengerjaan terhadap antosianin aman dilakukan dalam larutan yang asam.

Calkon dan Dihidrocalkon tersebar di alam dalam jumlah yang terbatas. Auron, tersebar di alam dalam jumlah yang terbatas. Auron memiliki kerangka benzalkumaranon. Auron merupakan pigmen kuning emas yang terdapat dalam bunga tertentu dan bryophita. Banyak dijumpai dalam bentuk glikosida atau eter metil.

Senyawa-senyawa isoflavonoid dan neoflavonoid hanya ditemukan dalam beberapa jenis tumbuhan. Isoflavonoid penting sebagai fitoaleksin. Yang termasuk isoflavonoid adalah isoflavon, rotenoid, pterokarpan dan kumestan sedangkan neoflavonoid meliputi 4-arilkumarin dan dalbergion.

## **2.6 Spektrofotometri UV-Vis**

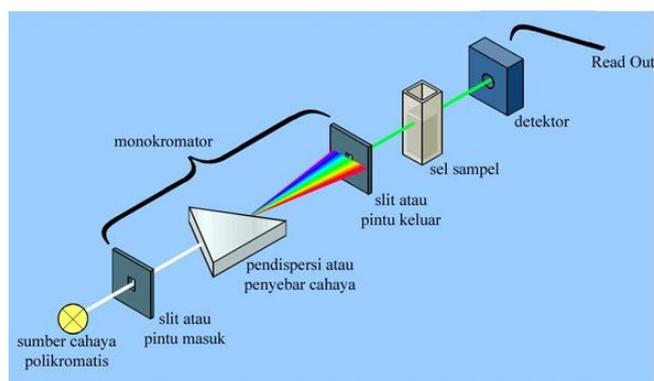
### **2.6.1 Definisi Spektrofotometri UV-Vis**

Penetapan kadar flavonoid total pada penelitian ini menggunakan menggunakan instrumen Spektrofotometri UV-VIS. Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380) dan sinar tampak (380-780) dengan memakai instrumen spektrofotometer (Noviyanto, 2020).

Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak

dipakai untuk analisis kuantitatif ketimbang kualitatif. Spektrofotometer terdiri atas spektrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Spektrofotometer tersusun atas sumber spektrum tampak yang kontinyu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blanko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blanko ataupun pembanding (Noviyanto, 2020).

### 2.6.2 Bagian-bagian Spektrofotometri UV-Vis



Gambar 2.3 Bagian-bagian Instrument Spektrofotometri UV-Vis

Menurut Khopkar (2003) bagian-bagian instrument Spektrofotometri UV-Vis adalah:

#### a. Sumber Cahaya

Sumber yang biasa digunakan pada spektroskopi absorpsi adalah lampu wolfram. Pada daerah UV digunakan lampu hidrogen atau lampu deuterium. Keباikan lampu wolfram adalah energi radiasi yang dibebaskan tidak bervariasi pada berbagai panjang gelombang.

b. Monokromator

Monokromator adalah alat yang akan memecah cahaya polikromatis menjadi cahaya tunggal (monokromatis) dengan komponen panjang gelombang tertentu. Monokromator berfungsi untuk mendapatkan radiasi monokromator dari sumber radiasi yang memancarkan radiasi polikromatis. Monokromator terdiri dari susunan: celah (slit) masuk filter - prisma - kisi (grating) - celah (slit) keluar.

c. Wadah sampel (kuvet)

Kuvet merupakan wadah sampel yang akan dianalisis. Kuvet dari leburan silika (kuarsa) dipakai untuk analisis kualitatif dan kuantitatif pada daerah pengukuran 190-1100 nm, dan kuvet dari bahan gelas dipakai pada daerah pengukuran 380-1100 nm karena bahan dari gelas mengabsorpsi radiasi UV.

d. Detektor

Detektor akan menangkap sinar yang diteruskan oleh larutan. Sinar kemudian diubah menjadi sinyal listrik oleh amplifier dan dalam rekorder akan ditampilkan dalam bentuk angka-angka pada reader (komputer).

e. Visual Display/Recorder

Merupakan sistem baca yang memperagakan besarnya isyarat listrik, menyatakan dalam bentuk % transmittan maupun Absorbansi.

### 2.6.3 Prinsip Kerja Spektrofotometri UV-Vis

Prinsip spektrofotometri adalah cahaya (monokromatik atau campuran) jatuh ke dalam medium homogen, sebagian cahaya jatuh dipantulkan, sebagian diserap oleh medium, dan sisanya diteruskan. Nilai dari cahaya yang ditransmisikan

dinyatakan sebagai nilai penyerapan. Karena berkaitan dengan konsentrasi sampel (Romadhani, 2016).

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam analisis Spektrofotometri UV-Vis menurut Rohman (2007):

1. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis

Hal ini perlu dilakukan jika senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tersebut. Cara yang digunakan adalah dengan merubah menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu.

2. Waktu Operasional (*operating time*)

Cara ini biasa digunakan untuk pengukuran hasil reaksi atau pembentukan warna. Tujuannya adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu operasional ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan.

3. Pemilihan Panjang Gelombang

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Untuk memilih panjang gelombang maksimal, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu.

## **2.7 Validasi Metode Analisis**

Metode yang digunakan di laboratorium kimia analitik harus dievaluasi dan diuji untuk memastikan bahwa metode tersebut mampu menghasilkan data yang valid dan sesuai dengan tujuan, maka metode tersebut harus divalidasi. Setiap

laboratorium direkomendasikan bahwa metode yang baik harus divalidasi ulang atau memverifikasi untuk memastikan bahwa metode tersebut bekerja benar dalam lingkungan lokal. Verifikasi melibatkan lebih sedikit parameter percobaan dibandingkan validasi (Riyanto, 2017).

Validasi metode sangat diperlukan karena beberapa alasan yaitu validasi metode merupakan elemen penting dari kontrol kualitas, validasi membantu memberikan jaminan bahwa pengukuran akan dapat diandalkan. Dalam beberapa bidang, validasi metode adalah persyaratan peraturan (Riyanto, 2017).

Menurut ISO 17025 validasi adalah konfirmasi dengan pemeriksaan dan penyediaan bukti obyektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud khusus yang terpenuhi. Menurut Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories, validasi adalah proses dimana prosedur dievaluasi untuk menentukan kemandirian dan keandalan untuk analisis. Untuk menunjukkan bahwa metode cocok untuk tujuan yang dimaksudkan (Riyanto, 2017).

Menurut EUROCHEM validasi adalah konfirmasi melalui pemeriksaan dan penyediaan bukti obyektif bahwa persyaratan tertentu untuk penggunaan yang dimaksudkan tertentu terpenuhi. Metode validasi adalah proses pembentukan karakteristik kinerja dan keterbatasan metode dan identifikasi pengaruh yang mungkin mengubah karakteristik ini dan sampai sejauh mana sekarang juga proses verifikasi bahwa suatu metode cocok untuk tujuan, yaitu. untuk digunakan untuk memecahkan analisis tertentu masalah. Beberapa tujuan validasi metode uji adalah:

1. Untuk menerima sampel individu sebagai anggota dari populasi yang diteliti.
2. Untuk mengakui sampel pada proses pengukuran

3. Untuk meminimalkan pertanyaan tentang keaslian sampel
4. Untuk memberikan kesempatan bagi resampling bila diperlukan

### 2.7.1 Presisi

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

*Repeatability* adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. *Repeatability* dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari batch yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal.

*Reproducibility* adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari batch yang sama. *Reproducibility* dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi, dan analis yang berbeda.

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV) 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan

kondisi laboratorium. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis.

Ditemukan bahwa koefisien variasi meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi analit. Pada kadar 1% atau lebih, standar deviasi relatif antara laboratorium adalah sekitar 2,5% ada pada satu per seribu adalah 5% Pada kadar satu per sejuta (ppm) RSDnya adalah 16%, dan pada kadar part per billion (ppb) adalah 32% Pada metode yang sangat kritis, secara umum diterima bahwa RSD harus lebih dan 2%.

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Sebaiknya keseksamaan ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) untuk melihat pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Demikian juga harus disiapkan sampel untuk menganalisis pengaruh pengotor dan hasil degradasi terhadap keseksamaan ini.

### **2.7.2 Akurasi**

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*).

Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam plasebo (semua campuran reagen yang digunakan minus analit), lalu campuran

tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar standar yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya. Recovery dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (eksepien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi. Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui seperti obat-obatan paten, atau karena analitnya berupa suatu senyawa endogen misalnya metabolit sekunder pada kultur kalus, maka dapat dipakai metode adisi.

Dalam metode adisi (penambahan baku), sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa (pure analit standar) ditambahkan ke dalam sampel, dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan).

Pada metode penambahan baku, pengukuran blanko tidak diperlukan lagi. Metode ini tidak dapat digunakan jika penambahan analit dapat mengganggu pengukuran. misalnya analit yang ditambahkan menyebabkan kekurangan pereaksi, mengubah pH atau kapasitas dapar. Dalam kedua metode tersebut, recovery dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Biasanya persyaratan untuk recovery adalah tidak boleh lebih dari 5%.

Akurasi menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (recovery) analit yang ditambahkan akurasi dapat ditentukan melalui dua cara. yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*).

### 2.7.3 *Limit Of Detection (LOD)* dan *Limit Of Quantification (LOQ)*

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Cara menentukan LOD dan LOQ ada tiga cara yaitu:

#### 1. *Signal-to-noise*

Dengan menggunakan metode *signal-to-noise* puncak ke puncak kebisingan di sekitar waktu retensi analit diukur, dan kemudian, konsentrasi analit yang akan menghasilkan sinyal sama dengan nilai tertentu dan kebisingan untuk sinyal rasio diperkirakan. Kebisingan besarnya dapat diukur secara manual pada print out kromatogram atau dengan auto integrator dari instrument. Sebuah *signal-to-noise* ratio (S/N) dari tiga umumnya diterima untuk memperkirakan LOD dan rasio *signal-to-noise* dan sepuluh digunakan untuk LOQ Metode ini biasanya diterapkan untuk metode analisis yang menunjukkan suara dasar.

#### 2. Penentuan blanko

Penentuan blanko diterapkan ketika analisis blanko memberikan hasil standar deviasi tidak nol. LOD dinyatakan sebagai konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah tiga standar deviasi dan LOQ adalah konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah sepuluh standar deviasi seperti yang ditunjukkan dalam persamaan berikut:

$$\text{LOD} = \bar{x} + 3S_b$$

$$\text{LOQ} = \bar{x} + 10 S_b$$

Dimana  $\bar{x}$  adalah konsentrasi rata-rata blanko dan  $S_b$  adalah standar deviasi dari blanko.

### 3. Kurva Kalibrasi

Untuk kurva kalibrasi linear, diasumsikan bahwa respon instrumen  $y$  berhubungan linier dengan konsentrasi  $x$  standar untuk rentang yang terbatas konsentrasi. Hal ini dapat dinyatakan dalam model seperti  $y = bx + a$  Model ini digunakan untuk menghitung sensitivitas  $b$  dan LOD dan LOQ. Oleh karena itu LOD dan LOQ dapat dinyatakan sebagai:

$$\text{LOD} = 3S_a/b$$

$$\text{LOQ} = 10 S_a/b$$

$S_a$  adalah standar deviasi dan  $b$  slope

Penentuan batas deteksi suatu metode berbeda-beda tergantung pada metode analisis itu menggunakan instrumen atau tidak. Pada analisis yang tidak menggunakan instrumen batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko dan formula di bawah ini dapat digunakan untuk perhitungan

$$Q = (k \times S_b)/S_l$$

$$Q = \text{LOD (batas deteksi) atau LOQ (batas kuantitasi)}$$

$$k = 3 \text{ untuk batas deteksi atau } 10 \text{ untuk batas kuantitasi}$$

$$S_b = \text{simpangan baku respon analitik dari blanko}$$

Sl = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis  $y = a+bx$ )

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier  $y = a + bx$ , sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ( $Sy/x$ .)

a. Batas deteksi (LoD)

Karena  $k = 3$ , Simpangan baku ( $Sb$ ) =  $Sy/x$ , maka:

$$LoD = (3 Sy/x)/Sl$$

b. Batas kuantitasi (LoQ)

Karena  $k = 10$ . Simpangan baku ( $Sb$ ) =  $Sy/x$ , maka:

$$LoQ = (10 Sy/x)/Sl$$

#### 2.7.4 Spesifisitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (degree of bias) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau

pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi.

Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya. Jika cecaran dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh, maka selektivitas dapat ditunjukkan dengan cara menganalisis sampel yang mengandung cecaran atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji lalu dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan Differential Scanning Calorimetry. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran selektivitas. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya ( $R_s$ ).

### **2.7.5 Linearitas**

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

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit.

Dalam beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit, data yang diperoleh diolah melalui transformasi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya.

Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50-150% kadar analit dalam sampel. Di dalam pustaka, sering ditemukan rentang konsentrasi yang digunakan antara 0-200%. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi  $r$  pada analisis regresi linier  $y = a + bx$ . Hubungan linier yang  $r = +1$  atau  $-1$  bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual ( $S_y$ ). Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer, semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur. Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

#### **2.7.6 Ketangguhan/Kekasaran (*ruggedness*)**

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dll. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau

lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara lab dan antar analis.

Ketangguhan metode ditentukan dengan menganalisis beningan suatu lot sampel yang homogen dalam lab yang berbeda oleh analis yang berbeda menggunakan kondisi operasi yang berbeda dan lingkungan yang berbeda tetapi menggunakan prosedur dan parameter uji yang sama.

Derajat ketertiruan hasil uji kemudian ditentukan sebagai fungsi dari variabel penentuan Ketertiruan dapat dibandingkan terhadap keseksamaan penentuan dibawah kondisi normal untuk mendapatkan ukuran ketangguhan metode. Perhitungannya dilakukan secara statistik menggunakan ANOVA pada kajian kolaboratif.

Kekasaran dari suatu metode analisis adalah resistensi terhadap perubahan dalam hasil yang dihasilkan oleh analisis metode ketika penyimpangan kecil terbuat dari kondisi percobaan yang dijelaskan dalam prosedur. Batas-batas untuk parameter eksperimental harus diresepkan dalam protokol metode (meskipun ini tidak selalu dilakukan di masa lalu), dan penyimpangan yang diperbolehkan seperti itu, secara terpisah atau dalam kombinasi apapun, harus menghasilkan tidak ada perubahan yang berarti dalam hasil yang dihasilkan. (A "perubahan yang berarti" di sini akan berarti bahwa metode ini tidak bisa beroperasi dalam batas-batas yang disepakati ketidakpastian mendefinisikan kebugaran untuk tujuan.) Aspek metode yang mungkin mempengaruhi hasil harus diidentifikasi, dan mereka pengaruh terhadap kinerja metode dievaluasi dengan menggunakan tes kekasaran. Kekasaran suatu metode diuji dengan sengaja memperkenalkan perubahan kecil prosedur dan

memeriksa efek pada hasil. Sejumlah aspek dari metode ini mungkin perlu dipertimbangkan, tetapi karena sebagian besar akan memiliki efek yang dapat diabaikan biasanya akan mungkin untuk bervariasi beberapa di sekali. Sebagai contoh, adalah mungkin untuk merumuskan pendekatan memanfaatkan delapan kombinasi dari tujuh variabel faktor, yaitu untuk melihat efek dari tujuh parameter dengan hanya delapan hasil analisis Univariat pendekatan juga layak, di mana hanya satu variabel pada suatu waktu berubah Contoh faktor-faktor yang tes kekasaran dapat mengatasi adalah: perubahan dalam instrumen, operator, atau merek reagen; konsentrasi reagen; pH suatu larutan; suhu reaksi; waktu diizinkan untuk menyelesaikan proses, dan lain-lain.

#### **2.7.7 Kekuatan/Ketahanan (*Robustness*)**

Ketahanan suatu metode analisis adalah ukuran dari kemampuannya untuk tetap tidak terpengaruh oleh variasi kecil, tetapi disengaja dalam parameter metode, dan memberikan indikasi kehandalan selama penggunaan normal. Ketangguhan metode kromatografi, misalnya, dapat dievaluasi oleh variasi dalam parameter seperti komposisi fase gerak, pH dan kekuatan ion, suhu dan banyak yang berbeda atau pemasok kolom. Evaluasi ketahanan harus dipertimbangkan dalam tahap pengembangan metode. Bahkan, proses validasi metode tidak dapat dipisahkan dari perkembangan aktual kondisi metode, karena tidak mungkin untuk mengetahui apakah kondisi metode dapat diterima sampai studi validasi dilakukan. Evaluasi kekokohan kromatografi metode sering kompleks dan melelahkan, dengan mempertimbangkan jumlah besar parameter analisis yang harus dianggap

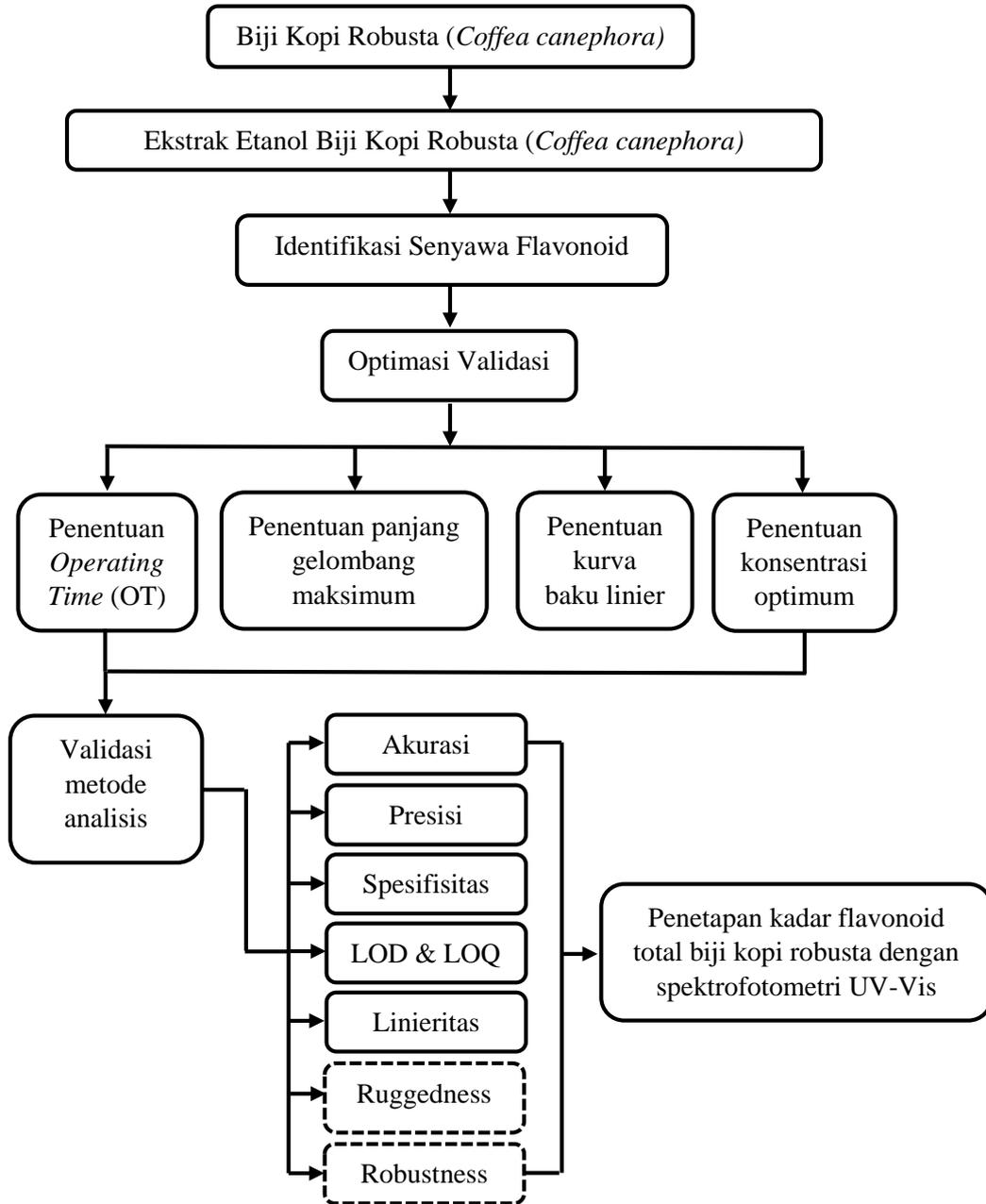
melakukan tes. Beberapa penulis memilih parameter analisis yang spesifik untuk dievaluasi, interpretasi data dilakukan dengan t-test atau uji ANOVA.

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi. Sebagai contoh, perubahan yang dibutuhkan untuk menunjukkan kekuatan prosedur HPLC dapat mencakup (tapi tidak dibatasi) perubahan komposisi organik fase gerak (1%), pH fase gerak ( $\pm 0,2$  unit), dan perubahan temperatur kolom ( $\pm 2-3^{\circ}$  C).

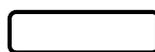
Perubahan lainnya dapat dilakukan bila sesuai dengan laboratorium. Identifikasi sekurang-kurangnya 3 faktor analisis yang dapat mempengaruhi hasil bila diganti atau diubah. Faktor risinal ini dapat diidentifikasi sebagai A, B, dan C. Perubahan nilai faktor-faktor ini dapat diidentifikasi dengan a, b, dan c. Lakukan analisis pada kondisi yang telah disebutkan pada pemeriksaan ketangguhan.

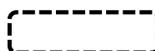
## BAB 3 KERANGKA KONSEP

### 3.1 Kerangka Konsep



#### Keterangan:

 = Diteliti

 = Tidak diteliti

Gambar 3.1 Kerangka Konsep

### 3.2 Hipotesis

Hipotesis berasal dari kata *Hypo* yang berarti dibawah dan *thesis* yang artinya kaidah. Sehingga hipotesis merupakan anggapan sementara terhadap hasil penelitian yang harus dibuktikan kebenarannya dengan menggunakan analisis yang sesuai (Sani K., 2018).

$H_0$  : Hipotesis nol ( $H_0$ ) adalah hipotesis penolakan. Dimana hipotesis ini merupakan hipotesis yang menyatakan tidak ada pengaruh, tidak ada hubungan atau tidak ada perbedaan antara variabel yang satu dengan variabel lainnya (Sani K., 2018).  $H_0$  pada penelitian ini yaitu penelitian optimasi dan validasi metode analisis tidak membuktikan bahwa parameter-parameter validitas suatu metode analisis spektrofotometri UV-Vis telah memenuhi syarat parameter validasi dan tidak dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar flavonoid total ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*).

$H_a$  : Hipotesis Alternatif ( $H_a$ ) adalah hipotesis penerimaan. Dimana hipotesis ini merupakan hipotesis yang menyatakan ada pengaruh, ada hubungan atau ada perbedaan antara variabel yang satu dengan variabel yang lainnya (Sani K., 2018).  $H_a$  penelitian ini yaitu penelitian optimasi dan validasi metode analisis membuktikan bahwa parameter-parameter validitas suatu metode analisis spektrofotometri UV-Vis telah memenuhi syarat parameter validasi dan dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar flavonoid total ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*).

## **BAB 4 METODE PENELITIAN**

### **4.1 Desain Penelitian**

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah kuantitatif dengan menggunakan analisis hasil laboratorium. Penelitian yang dilakukan adalah validasi metode analisis untuk penetapan kadar flavonoid total biji kopi robusta menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Ekstraksi biji kopi dilakukan dengan metode maserasi. Kadar flavonoid total ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan standar kuersetin.

### **4.2 Populasi dan Sampel**

#### **4.2.1 Populasi**

Populasi merupakan keseluruhan total dari objek yang akan menjadi bahan penelitian sesuai dengan karakteristik yang diinginkan dalam penelitian (Sani K., 2018). Populasi pada penelitian ini yaitu tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) yang ditanam di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember.

#### **4.2.2 Sampel**

Sampel adalah bagian yang dapat mewakili populasi untuk dijadikan sebagai objek dari penelitian (Sani K., 2018). Sampel penelitian yang digunakan yaitu pada bagian biji tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*).

### **4.3 Variabel Penelitian**

Variabel penelitian adalah poin-poin yang akan menjadi karakteristik suatu penelitian (Sani K., 2018).

#### **4.3.1 Variabel Bebas (Independent variable)**

Variabel bebas merupakan variabel yang memberikan pengaruh atau faktor yang menyebabkan variabel dependent menjadi berubah (Sani K., 2018). Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*).

#### **4.3.2 Variabel Terikat (Dependent variable)**

Variabel terikat merupakan variabel akibat dari adanya variabel bebas (Sani K., 2018). Variabel terikat pada penelitian ini adalah parameter validasi metode analisis dan kadar flavonoid total.

#### **4.4 Tempat Penelitian**

Tempat penelitian adalah keterangan tempat peneliti melakukan penelitiannya sesuai dengan tujuan dan desain penelitian yang digunakan (Sani K., 2018). Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas dr. Soebandi untuk melaksanakan proses ekstraksi atau pengolahan sampel dari simplisia biji kopi robusta (*Coffea canephora*) lalu dilanjutkan menggunakan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas dr. Soebandi untuk proses optimasi serta validasi metode analisis.

#### **4.5 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian adalah lama waktu yang dibutuhkan peneliti untuk dapat menyelesaikan penelitiannya dari mulai penyusunan proposal hingga akhir penelitian (Sani K., 2018). Waktu penelitian dimulai pada bulan Agustus 2022.

#### 4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional merupakan batasan ruang lingkup variabel yang akan menjadi bahan penelitian (Sani K., 2018).

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Nama Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Ekstrak etanol biji kopi robusta ( <i>Coffea canephora</i> )	Ekstrak kental yang diperoleh dari metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.	Maserator	Ekstrak kental di timbang dan di hitung hasil rendemennya	Satuan hasil ukur rendemen dinyatakan dalam %.	Rasio
Parameter validasi metode analisis yang meliputi Akurasi, Presisi, Spesifisitas, <i>Limit Of Detection</i> (LOD), <i>Limit Of Quantification</i> (LOQ), dan Linieritas	<ul style="list-style-type: none"> <li>– <b>Akurasi</b> Ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya (Riyanto, 2017).</li> <li>– <b>Presisi</b> Ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen (Riyanto, 2017).</li> <li>– <b>Spesifisitas</b> Kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (Harmita, 2004).</li> <li>– <b>Limit Of Detection (LOD)</b></li> </ul>	Spektrofotometer	<ul style="list-style-type: none"> <li>– <b>Akurasi</b> Pengujian akurasi dengan cara membagi hasil konsentrasi analit yang didapat dengan konsentrasi analit yang sebenarnya</li> <li>– <b>Presisi</b> Pengujian presisi dengan cara luas area yang diperoleh dirata-ratakan dan dihitung nilai RSDnya</li> <li>– <b>Spesifisitas</b> Pengujian spesifisitas dilakukan dengan cara membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, dan senyawa sejenis.</li> <li>– <b>Limit Of Detection (LOD)</b> Pengujian batas deteksi dilakukan dengan mengukur konsentrasi yang diinjeksikan pada rasio sinyal terhadap <i>noise</i> yang dibagi dengan luas area yang diperoleh (Rohman, 2007).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– <b>Akurasi</b> Satuan hasil ukur akurasi biasanya dinyatakan %.</li> <li>– <b>Presisi</b> Satuan hasil ukur presisi dinyatakan dalam %.</li> <li>– <b>Spesifisitas</b> Satuan hasil ukur spesifisitas dinyatakan dinyatakan dalam mg/L.</li> <li>– <b>Limit Of Detection (LOD)</b> Satuan hasil ukur batas deteksi dinyatakan dalam ppm.</li> <li>– <b>Limit Of Quantification (LOQ)</b> Satuan hasil ukur batas kuantitasi dinyatakan dalam ppm.</li> <li>– <b>Linieritas</b></li> </ul>	Rasio

	<p>Jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko (Riyanto, 2017).</p> <p>– <b>Limit Of Quantification (LOQ)</b> Parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Riyanto, 2017).</p> <p>– <b>Linieritas</b> Kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Riyanto, 2017).</p>	<p>– <b>Limit Of Quantification (LOQ)</b> Pengujian batas kuantitasi dengan cara mengukur konsentrasi yang diinjeksikan pada rasio sinyal terhadap <i>noise</i> yang dibagi dengan luas yang diperoleh.</p> <p>– <b>Linieritas</b> Pengujian linieritas diukur dengan cara luas area yang diperoleh diplotkan dengan konsentrasi analit lalu dihitung nilai r.</p>	<p>Satuan hasil ukur linieritas dinyatakan dalam nilai r (Riyanto, 2017).</p>		
Kadar flavonoid total	<p>Kadar flavonoid total adalah penetapan jumlah kandungan total flavonoid dalam ekstrak etanol biji kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>)</p>	$\text{Kadar} = \frac{C \times V \times Fp}{W}$ <p>Keterangan : C = Konsentrasi senyawa dalam larutan sampel (µg/ml) V = Volume larutan sampel (ml) Fp = Faktor Pengenceran W = Berat sampel (g)</p>	<p>Dihitung dengan mendistribusikan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan garis regresi linear yang didapat pada kurva kalibrasi untuk mendapatkan konsentrasinya. Nilai konsentrasi sampel yang didapat kemudian didistribusikan lagi kedalam rumus perhitungan</p>	<p>Satuan hasil ukur kadar dinyatakan dalam µg/g.</p>	Rasio

## **4.7 Teknik Pengumpulan Data**

### **4.7.1 Preparasi Sampel**

#### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman kopi robusta dilakukan di Politeknik Negeri Jember pada bulan Juni 2022.

#### 2. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Kabupaten Jember berupa biji kopi robusta yang sudah dihaluskan.

#### 3. Ekstraksi Sampel

Biji kopi robusta yang telah dihaluskan kemudian diekstraksi, ekstraksi sampel biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Proses ekstraksi digunakan metode maserasi dan remaserasi dengan perbandingan 1:10. Sebanyak 300g serbuk simplisia di ekstraksi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3000 mL selama 7 hari dengan pengadukan 1 kali sehari selama 5 menit. Hasil ekstraksi kemudian disaring menggunakan kertas saring dengan corong, lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C kemudian dipekatkan diatas *waterbath* dengan suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental (Wardaningrum, 2020).

### **4.7.2 Skrining Fitokimia Flavonoid**

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 5 mL akuades, kemudian dipanaskan selama 5 menit, dan saring. Filtrat ditambah 0,1 gram serbuk Mg dan

1 mL HCl pekat kemudian dikocok. Uji positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga (Dewi et al., 2021).

#### 4.7.3 Preparasi Larutan Sampel dan Standar

##### 1. Pembuatan Larutan Sampel

Ditimbang 10 mg ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dan dilarutkan dalam 10 mL etanol pro analisis.

##### 2. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Ditimbang 10 mg baku standar kuersetin dan dilarutkan dalam 10 mL etanol pro analisis untuk 1000 ppm (LIB I). Lalu dipipet 3 mL dari LIB I dimasukkan kedalam labu terukur 50 mL dicukupkan dengan etanol sampai tanda batas untuk 60 ppm (LIB II).

#### 4.7.4 Optimasi Metode Analisis

##### 1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Dipipet 4 mL dari Larutan Induk Baku II (LIB II) masukan kedalam labu terukur 10 mL, lalu ditambahkan 0,1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, dan tambahkan 2,8 mL aquadest, lalu ditambahkan etanol sampai tanda batas, dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 400-500 nm.

##### 2. Penentuan *Operating Time*

Dipipet 4 mL dari Larutan Induk Baku II (LIB II) masukan kedalam labu terukur 10 mL, ditambah 0,1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, dan tambahkan 2,8 mL aquadest, lalu ditambahkan etanol sampai tanda batas. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang

telah diperoleh dengan interval waktu 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

### 3. Penentuan Kurva Baku Linier

Larutan baku dibuat dengan cara menimbang kuersetin secara seksama 10 mg pada neraca analitik, kuersetin kemudian dilarutkan dengan etanol *add* 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan baku 1000 ppm kuersetin dibuat dengan variasi konsentrasi 50, 60, 70, 80, 90 dan 100 ppm. Dipipet sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam labu terukur 10 mL kemudian ditambahkan 1,5 mL etanol, 0,1 ml  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest, ditambahkan etanol sampai tanda batas, dihomogenkan dan didiamkan selama waktu *operating time*. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum.

### 4. Penentuan Konsentrasi Optimum

Dibuat larutan standar kuersetin dan sampel dalam pelarut dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Dipipet sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam labu terukur 10 mL kemudian ditambahkan 1,5 mL etanol, 0,1 ml  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest, ditambahkan etanol sampai tanda batas, dihomogenkan dan didiamkan selama waktu *operating time*.

#### 4.7.5 Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis

##### 1. Akurasi

Uji ketepatan atau akurasi dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku (*standar addition method*). Uji dilakukan untuk memperoleh nilai persen perolehan kembali dalam penambahan volume larutan uji ekstrak etanol ditambah dengan larutan standar kuersetin hingga mencapai konsentrasi optimum 80%, 100%, dan 120%. Ketiga sampel tersebut dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Hasil dinyatakan dalam persen perolehan kembali (% *recovery*) (Sukmawati et al., 2018). Hasil absorbansi digunakan untuk menghitung persen perolehan kembali dengan rumus :

$$\text{Recovery} = \frac{\text{kadar terukur}}{\text{kadar sebenarnya}} \times 100\%$$

Hasil persentase *recovery* untuk keperluan analisis dikatakan memenuhi syarat jika menunjukkan persentase antara 80-110% (Wisudyaningih, 2012).

##### 2. Presisi

Pengujian presisi yang dilakukan adalah kategori keterulangan (*repeatability*). Uji ketelitian ini dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan. Uji presisi (keeksamaan) ditentukan dengan parameter RSD (*Relative Standard Deviasi*) (Sukmawati et al., 2018).

##### 3. Spesifisitas

Pengujian selektivitas maka zat yang akan diuji harus ditentukan dulu panjang gelombang maksimum. Selanjutnya dibuat larutan baku, larutan uji

dan larutan blanko. Larutan dibaca pada panjang gelombang maksimum. Analisis dengan spektrofotometer UV-Vis dan ditentukan spesifisitasnya.

#### 4. LOD dan LOQ

Batas deteksi dan batas kuantitas dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi dengan membuat larutan baku kerja dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm. Dipipet sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam labu terukur 10 mL kemudian ditambahkan 1,5 mL etanol, 0,1 ml  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest, ditambahkan etanol sampai tanda batas. Setelah itu diinkubasi selama 20 menit, absorbansi dari larutan pembanding diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Setelah diukur absorbansi dari larutan baku kerja dicari persamaan regresi antara kadar (konsentrasi) dengan absorbansi. Kemudian dihitung harga *Limit Of Detection* dan *Limit Of Quantitation* (Sukmawati et al., 2018).

#### 5. Linieritas

Linieritas dilakukan dengan cara membuat larutan baku kuersetin 1000 ppm kemudian dibuat larutan baku kerja dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm . Dipipet sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam labu terukur 10 mL kemudian ditambahkan 1,5 mL etanol, 0,1 ml  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest, ditambahkan etanol sampai tanda batas. Setelah itu diinkubasi selama 20 menit, absorbansi dari larutan pembanding

diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Kurva hubungan antara kadar dan serapan dibuat kemudian ditentukan persamaan regresi linier serta koefisien korelasi ( $r$ ) dan koefisien korelasi dari fungsi ( $V_{xo}$ ) untuk mengevaluasi linieritas. Berdasarkan nilai koefisien korelasi dapat diketahui linieritasnya baik atau tidak. Koefisien korelasi dikatakan baik apabila  $r \geq 0,98$  dan koefisien fungsi regresi ( $V_{xo}$ )  $\leq 5\%$  (Sukmawati et al., 2018).

#### **4.7.6 Penetapan Kadar Flavonoid Total Biji Kopi Robusta**

Ditimbang 25 mg ekstrak etanol biji kopi robusta dilarutkan dalam 25 mL etanol. Dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan 1,5 mL etanol, 0,1 ml  $AlCl_3$  10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest, ditambahkan etanol sampai tanda batas. Setelah itu diinkubasi selama 20 menit, absorbansi dari larutan pembanding diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Larutan sampel dibuat dalam tiga kali replikasi sehingga kadar flavonoid yang diperoleh sebagai ekuivalen kuersetin.

#### **4.8 Teknik Analisis Data**

Kadar flavonoid total ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dapat dihitung dengan mendistribusikan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan garis regresi linear yang didapat pada kurva kalibrasi untuk mendapatkan konsentrasinya. Nilai konsentrasi sampel yang didapat kemudian didistribusikan lagi kedalam rumus perhitungan sebagai berikut (Yeti, 2021):

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

Keterangan :

C = Konsentrasi senyawa dalam larutan sampel

V = Volume larutan sampel

Fp = Faktor Pengenceran

W = Berat sampel

#### 4.9 SOP (Standar Operasional Prosedur)

Tabel 3.2 SOP (Standar Operasional Prosedur)

Kegiatan	Prosedur
Pengambilan sampel	Pengambilan bahan yang diambil dari pusat penelitian kopi dan kakao Jember berupa biji kopi robusta yang telah dihaluskan
Pembuatan ekstrak	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Penimbangan serbuk biji kopi robusta dan pengukuran etanol</li> <li>- Ekstraksi menggunakan metode maserasi</li> <li>- Hasil maserasi diuapkan menggunakan <i>rotary evaporator</i> hingga mendapatkan ekstrak kental</li> <li>- Hitung persen rendemen</li> </ul>
Skrining fitokimia	Uji flavonoid
Optimasi validasi metode	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Penentuan <i>operating time</i></li> <li>- Penentuan panjang gelombang maksimum</li> <li>- Penentuan kurva baku linier</li> <li>- Penentuan konsentrasi optimum</li> </ul>
Validasi metode analisis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Akurasi</li> <li>- Presisi</li> <li>- Spesifisitas</li> <li>- LOD dan LOQ</li> <li>- Linieritas</li> </ul>
Pengolahan data	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kadar flavonoid total ekstrak etanol biji kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>) dihitung dengan mendistribusikan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan garis regresi linear yang didapat pada kurva kalibrasi untuk mendapatkan konsentrasinya</li> <li>- Nilai konsentrasi sampel yang didapat kemudian didistribusikan lagi kedalam rumus perhitungan</li> </ul>

## BAB 5 HASIL PENELITIAN

### 5.1 Determinasi Tanaman

Hasil identifikasi diketahui bahwa tanaman yang digunakan adalah benar biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Hasil determinasi tanaman dapat dilihat pada lampiran 1.

### 5.2 Ekstraksi Biji Kopi Robusta

Maserasi biji kopi robusta (*Coffea canephora*) diperoleh bobot ekstrak sebanyak 57,14 gram dan diperoleh nilai rendemen hasil ekstraksi adalah 19,04% b/b. Perhitungan rendemen ekstrak etanol biji kopi robusta dapat dilihat pada lampiran 2.

### 5.3 Skrining Fitokimia Flavonoid

Skrining fitokimia flavonoid menunjukkan ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) positif mengandung flavonoid. Hasil skrining fitokimia flavonoid dapat dilihat pada Tabel 5.1 dan lampiran 3.

Tabel 5.1 Hasil Skrining Fitokimia Flavonoid

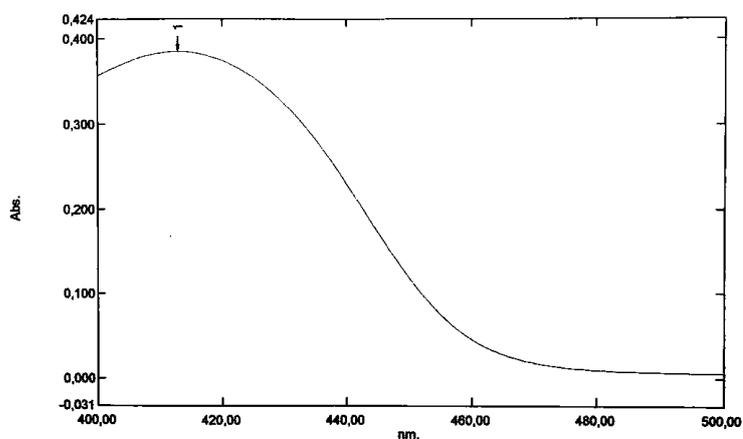
Skrining Fitokimia	Pereaksi	Pengamatan	Hasil
Flavonoid	Mg + HCl Pekat	Terbentuk warna merah	( + )

Keterangan : ( + ) Positif  
( - ) Negatif

## 5.4 Optimasi Metode Analisis

### 5.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

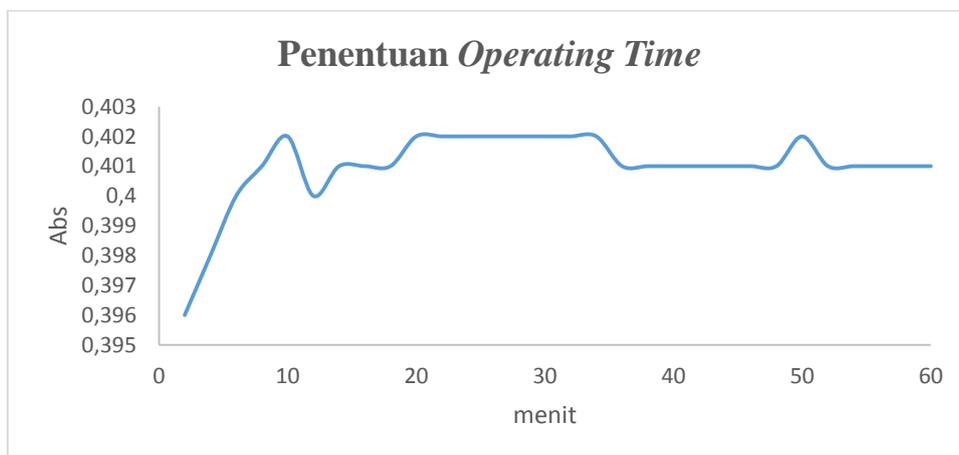
Penentuan panjang gelombang maksimum diperoleh pada panjang gelombang 413,00 nm. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

### 5.4.2 Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* diperoleh absorbansi yang stabil pada menit ke-20. Hasil penentuan *operating time* dapat dilihat pada gambar 5.2 dan tabel 5.2



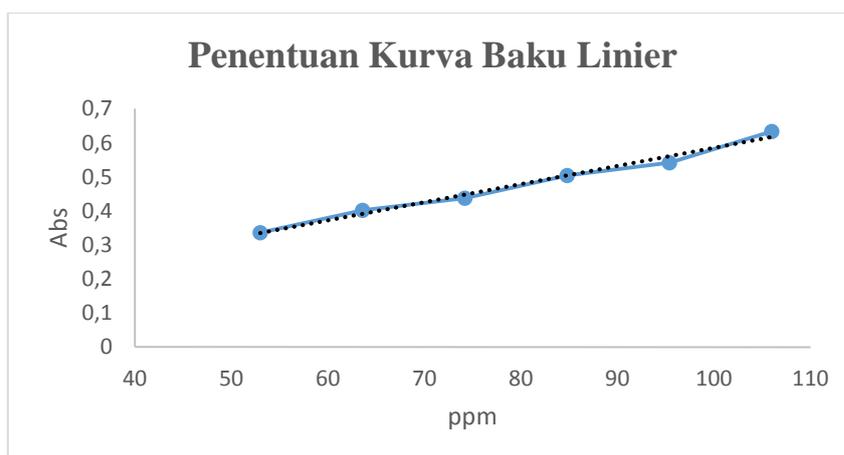
Gambar 5.2 Penentuan *Operating Time*

Tabel 5.2 Penentuan *Operating Time*

Menit	Absorbansi
20	0,402
22	0,402
24	0,402
26	0,402
28	0,402
30	0,402

### 5.4.3 Penentuan Kurva Baku Linier

Penentuan kurva baku linier menghasilkan persamaan regresi  $y = 0,0056x + 0,0526$  dengan nilai  $r = 0,9923$ . Hasil penentuan kurva baku linier dapat dilihat pada gambar 5.4.



Gambar 5.3 Penentuan Kurva Baku Linier

### 5.4.4 Penentuan Konsentrasi Optimum

Penentuan konsentrasi optimum didapatkan di konsentrasi standar kuersetin 50 ppm dan sampel ekstrak etanol 50 ppm dengan persen RSD 99,428%. Hasil penentuan konsentrasi optimum dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.3 Penentuan Konsentrasi Optimum

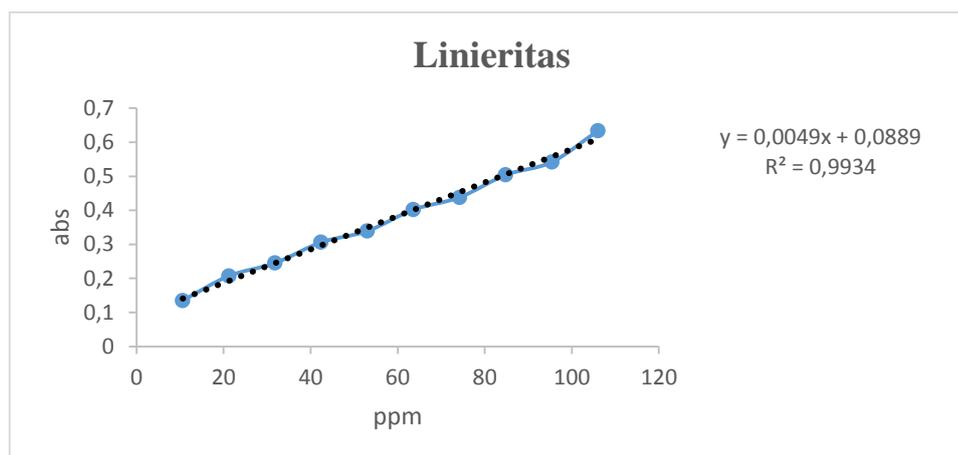
Konsentrasi	Absorbansi	%RSD
Standar 10 ppm	0,135	147,143%
Standar 20 ppm	0,207	137,857%
Standar 30 ppm	0,245	114,523%
Standar 40 ppm	0,306	113,125%
Standar 50 ppm	0,339	102,285%

Sampel 10 ppm	0,133	107,857%
Sampel 20 ppm	0,191	123,571%
Sampel 30 ppm	0,233	107,381%
Sampel 40 ppm	0,302	111,339%
Sampel 50 ppm	0,331	99,428%

## 5.5 Validasi Metode Analisis

### 5.4.1 Linieritas

Uji linieritas menghasilkan persamaan regresi  $y = 0,0049x + 0,0889$  dengan nilai  $r = 0,9934$  dan  $V_{xo} = 3,273225\%$ , sehingga larutan standar kuersetin dengan rentang 0-200 ppm adalah linier. Kurva linieritas standar kuersetin dapat dilihat pada gambar 5.4.



Gambar 5.4 Linieritas

### 5.4.2 LOD & LOQ

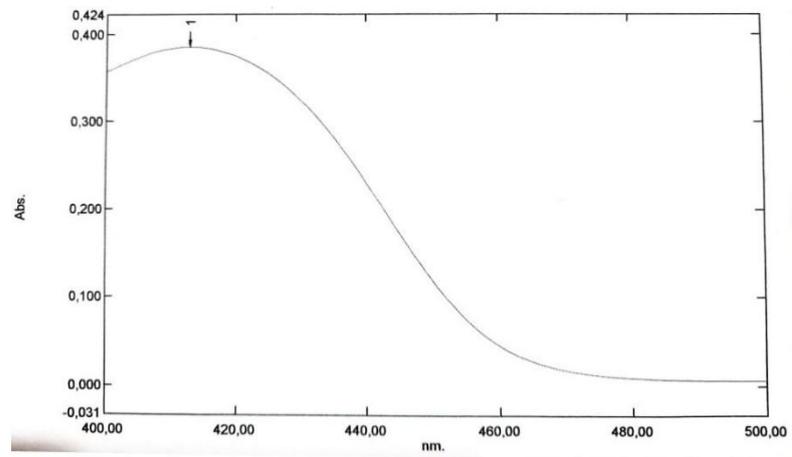
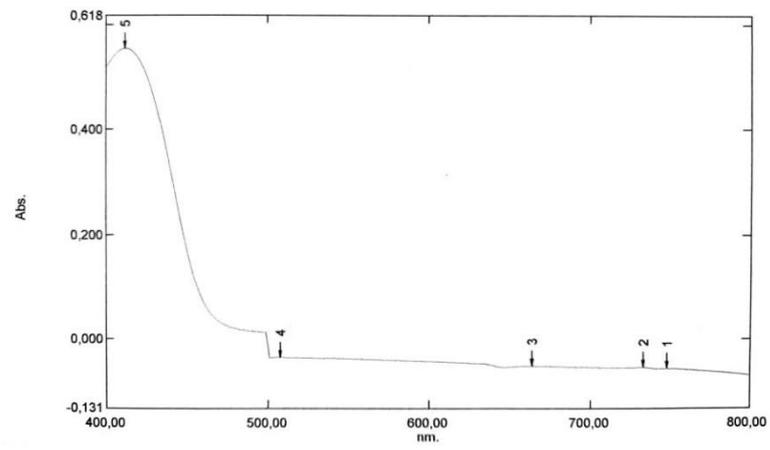
Hasil uji limit deteksi dan limit kuantitasi diperoleh persamaan garis regresi  $y = 0,0049x + 0,0889$  dengan nilai  $r = 0,9934$ . Limit deteksi dan limit kuantitasi 8,376184 ppm dan 27,92061 ppm. Hasil penentuan LOD dan LOQ dapat dilihat pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 LOD &amp; LOQ

No	Konsentrasi (x)	Absorbansi (y)	y'	y'-y	(y'-y) <sup>2</sup>
1	10,6 ppm	0,135	0,1408	0,0058	0,00003364
2	21,2 ppm	0,207	0,1927	-0,0143	0,00020449
3	31,8 ppm	0,245	0,2447	-0,0003	9E-08
4	42,4 ppm	0,306	0,2967	-0,0093	8,649E-05
5	53 ppm	0,339	0,3486	0,0096	9,216E-05
6	63,6 ppm	0,402	0,4005	-0,0015	0,00000225
7	74,2 ppm	0,438	0,4525	0,0145	0,00021025
8	84,8 ppm	0,504	0,5044	0,0004	1,6E-07
9	95,4 ppm	0,542	0,5564	0,0144	0,00020736
10	106 ppm	0,634	0,6083	-0,0257	0,00066049
		<b>Jumlah</b>			<b>0,00149738</b>
		<b>S<sup>y</sup>/<sub>x</sub></b>			<b>0,013681</b>
		<b>LOD</b>			<b>8,376184 ppm</b>
		<b>LOQ</b>			<b>27,92061 ppm</b>

### 5.4.3 Spesifisitas

Pengukuran spesifisitas dilakukan dengan membandingkan spektra standar, sampel, dan campuran sampel dengan analit lain. Pada penelitian ini digunakan standar dan sampel hasil optimasi konsentrasi. Berdasarkan perbandingan spektra standar kuersetin dan sampel ekstrak etanol biji kopi robusta menunjukkan spektra untuk standar kuersetin memiliki panjang gelombang 413,00 nm dengan absorbansi sebesar 0,386, sampel ekstrak etanol biji kopi robusta memiliki panjang gelombang 410,00 nm dengan absorbansi sebesar 0,350, dan campuran sampel dengan analit lain memiliki panjang gelombang 412,00 nm dengan absorbansi 0,555. Spektra hasil pengukuran dapat dilihat pada gambar 5.5, dan 5.6

Gambar 5.5 Spektra Standar  $\lambda$  413 nmGambar 5.6 Spektra Sampel  $\lambda$  412 nm

#### 5.4.4 Akurasi

Hasil uji akurasi ditunjukkan dengan nilai persen recovery, dimana dikatakan memenuhi syarat jika menunjukkan presentase antara 80-110%, sehingga hasil uji akurasi pada penelitian ini dikatakan memenuhi persyaratan persen recovery. Hasil penentuan akurasi dapat dilihat pada tabel 5.5.

Tabel 5.5 Akurasi

Konsentrasi	Absorbansi	Sampel (ppm)	Standar (ppm)	Kadar (ppm)	Rata-rata	%Recovery	Rata-rata	SD	%RSD	
80%	0,542	50	42	92,46939	92,4013	100,1652	100,0032	0,742238	0,742214	
	0,543			92,67347		100,6511				
	0,540			92,06122		99,19339				
100%	0,592		52,5	52,5	102,6735	102,8095	99,56851	99,82766	1,956549	1,959927
	0,588				101,8571		98,01361			
	0,598				103,8980		101,9009			
120%	0,657	63	63	115,9388	115,7346	104,0298	103,7059	0,561079	0,541029	
	0,657			115,9388		104,0298				
	0,654			115,3265		103,0580				

### 5.4.5 Presisi

Hasil uji presisi diukur kadarnya dengan menggunakan persamaan  $y = 0,0049x + 0,0889$  dengan nilai  $r = 0,9934$ , hasil perhitungan ditunjukkan pada tabel.

Hasil dari nilai presisi ditunjukkan dengan nilai %RSD yang tidak lebih dari 1,5%.

Hasil penentuan presisi dapat dilihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.6 Presisi

Konsentrasi	Replikasi	Abs	Kadar (ppm)	Rata-rata	SD	%RSD
80%	1	0,542	92,46939	92,36735	0,281309	0,304555
	2	0,543	92,67347			
	3	0,540	92,06122			
	4	0,541	92,26531			
	5	0,540	92,06122			
	6	0,543	92,67347			
100%	1	0,592	102,6735	102,9456	0,802627	0,779661
	2	0,588	101,8571			
	3	0,598	103,8980			
	4	0,596	103,4898			
	5	0,590	102,2653			
	6	0,596	103,4898			
120%	1	0,657	115,9388	115,3265	0,562621	0,487851
	2	0,657	115,9388			
	3	0,654	115,3265			
	4	0,650	114,5102			
	5	0,654	115,3265			
	6	0,652	114,9184			

## 5.6 Penetapan Kadar Flavonoid Total Biji Kopi Robusta

Kadar flavonoid total dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi sampel pada persamaan regresi standar kuersetin  $y = 0,0056x + 0,0526$ . Kemudian dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kadar } (\mu\text{g/g}) = \frac{C \times V \times Fp}{W}$$

Hasil penentuan kadar flavonoid total ekstrak etanol biji kopi robusta dapat dilihat pada tabel 5.7.

Tabel 5.7 Penetapan Kadar

Replikasi	Penimbangan (mg)	Absorbansi	Kadar (mg/g)	Kadar (ppm)	Rata-rata kadar	SD	%RSD
1	25,1	0,333	0,4987	19,948	19,935	0,1077	0,54
2	25,6	0,340	0,5011	20,004			
3	25,4	0,335	0,4963	19,852			

## **BAB 6 PEMBAHASAN**

### **6.1 Skrining Fitokimia Flavonoid**

Skrining fitokimia flavonoid ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dihasilkan perubahan warna larutan menjadi warna merah jingga hal ini dikarenakan pereaksi logam magnesium (Mg) dan asam klorida pekat (HCl). Penambahan serbuk logam Mg bertujuan agar membentuk ikatan gugus karbonil pada senyawa flavonoid, kemudian penambahan HCl pekat bertujuan untuk pembentukan garam flavilum yang ditandai dengan perubahan warna merah jingga (Sulasmi et al., 2018).

Pada skrining fitokimia flavonoid didapatkan kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang ditandai dengan terbentuknya warna merah jingga.

### **6.2 Optimasi Metode Analisis**

Optimasi bertujuan untuk mendapatkan hasil yang maksimal dengan tingkat sensitivitas yang tinggi untuk memperoleh kondisi optimum pada suatu proses yang menghasilkan nilai terbaik dari kriteria kerja (Arikalang et al., 2018).

#### **6.2.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Penentuan panjang gelombang maksimum ini bertujuan untuk mengetahui pada panjang gelombang berapa yang dapat menghasilkan nilai absorbansi maksimum, sehingga didapatkan nilai absorbansi yang akurat (Rohmah et al., 2021). Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum untuk larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 60 ppm dimulai pada panjang gelombang 400-500 nm

dan panjang gelombang maksimum ditunjukkan pada panjang gelombang 413 nm dengan memberikan nilai absorbansi 0,386.

### 6.2.2 Penentuan *Operating Time*

Dari hasil yang diperoleh, absorbansi yang stabil pada menit ke-20 sampai menit ke-30. Tujuan penetapan *operating time* untuk mendapatkan waktu pengukuran pada saat reaksi telah berjalan optimal yang ditandai dari absorbansi yang stabil, sehingga dapat memaksimalkan pengukuran. Kenaikan absorbansi secara terus-menerus dari menit ke menit tidak dapat dijadikan sebagai *operating time* karena perubahan absorbansi masih terus berjalan, sehingga pengukuran menjadi tidak maksimal jika dilakukan pada waktu tersebut. Sebaliknya ketika absorbansi mulai stabil merupakan waktu yang tepat dijadikan sebagai *operating time* (Arikalang et al., 2018). *Operating time* pada penelitian ini pada menit ke-20 sampai menit ke-30 dengan absorbansi 0,402.

### 6.2.3 Penentuan Kurva Baku Linier

Pembuatan kurva baku digunakan untuk mencari persamaan regresi linear sehingga dapat digunakan dalam pencarian suatu kadar yang absorbansinya sudah diukur. Grafik kurva baku standar kuersetin dapat dilihat pada gambar 5.3 dengan nilai *intercept* (a) = 0,0526 dan nilai *slope* (b) = 0,0056x dengan nilai korelasi (r) = 0,9923. Data absorbansi yang dihasilkan sudah tergolong baik, karena semua seri kadar dari nilai yang terkecil hingga yang terbesar memiliki nilai absorbansi sebesar 0,2 – 0,8, sedangkan nilai korelasi yang didapat yaitu sebesar 0,9923, hal ini dikatakan sangat baik karena nilai korelasi yang baik hampir mendekati 1.

#### **6.2.4 Penentuan Konsentrasi Optimum**

Dibuat seri kadar larutan standar baku dan sampel sebanyak 10 mL dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Masing-masing seri kadar dipipet sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL ditambahkan 0,1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, 0,1 mL Natrium asetat 1 M, 2,8 mL aquadest, dan etanol 96% sampai tanda batas (Yeti & Rafita, 2021). Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum.

### **6.3 Validasi Metode Analisis**

Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Validasi metode analisis bertujuan untuk memastikan dan mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai dan memenuhi persyaratan (Ulfa et al., 2017).

United States Pharmacopeia (USP) telah menyatakan bahwa tidak selamanya parameter untuk mengevaluasi validasi metode harus diuji, sehingga pengujian validasi dari metode analisis ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*), hanya 5 parameter yang diuji, yaitu spesifisitas, akurasi, presisi, linearitas, batas deteksi, dan batas kuantitas, karena kelima parameter tersebut telah mewakili data yang dibutuhkan untuk uji validasi.

#### **6.3.1 Linieritas**

Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linieritas menunjukkan kemampuan suatu metode analisis untuk memperoleh hasil pengujian yang sesuai

dengan konsentrasi analit yang terdapat pada sampel pada kisaran konsentrasi tertentu.

Hasil analisis regresi berdasarkan metode spektrofotometri diperoleh persamaan linier  $y = 0,0049x + 0,0889$  dengan nilai koefisien korelasi  $r = 0,9934$ . Koefisien korelasi ini memberikan hasil yang linear karena memenuhi kriteria penerimaan yaitu  $\geq 0,98$ , koefisien fungsi regresi ( $V_{x0}$ ) juga merupakan syarat dari linieritas dimana nilainya  $< 5\%$  (Harmita, 2004; (Alwi, 2017)). Hasil  $V_{x0}$  dari pengukuran yaitu  $3,273225\%$ , sehingga penggunaan metode spektrofotometri UV dapat digunakan untuk analisis dengan hasil yang baik.

### 6.3.2 LOD & LOQ

Batas deteksi adalah konsentrasi analit terendah dalam contoh yang dapat dideteksi, akan tetapi tidak perlu ditentukan secara kuantitatif hingga didapatkan nilai yang persis. Sedangkan batas kuantitas adalah konsentrasi terendah dalam contoh yang dapat diukur secara kuantitatif dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Penentuan batas deteksi dan batas kuantitas untuk metode spektrofotometri UV berdasarkan simpangan respon dan kemiringan (*slope*) kurva kalibrasi (Alwi, 2017).

LOD dan LOQ ditentukan dengan membaca absorbansi larutan standar konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm. Hasil uji batas deteksi dan batas kuantitas diperoleh persamaan  $y = 0,0049x + 0,0889$  dengan nilai  $r = 0,9934$ . Nilai  $S_{y/x}$  yang diperoleh yaitu  $0,013681$  sehingga batas deteksi yang diperoleh  $8,376184$  ppm yang artinya pada konsentrasi tersebut masih dapat dilakukan pengukuran sampel yang memberikan hasil ketelitian suatu alat

berdasarkan tingkat akurasi individual hasil analisis. Sedangkan, batas kuantitasi yang diperoleh sebesar 27,92061 ppm yang artinya pada konsentrasi tersebut bila dilakukan pengukuran dapat memberikan kecermatan analisis.

### **6.3.3 Spesifisitas**

Spesifitas merupakan kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dengan adanya komponen – komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks (USP XXXVII, 2014).

Pengukuran spesifisitas dilakukan dengan membandingkan spektra standar dan sampel. Pada penelitian ini digunakan standar dan sampel hasil optimasi konsentrasi. Berdasarkan perbandingan spektra standar kuersetin dan sampel ekstrak etanol biji kopi robusta menunjukkan spektra untuk standar kuersetin memiliki panjang gelombang 413,00 nm dengan absorbansi sebesar 0,386 dan sampel ekstrak etanol biji kopi robusta memiliki panjang gelombang 412,00 nm dengan absorbansi 0,555. Berdasarkan hasil perbandingan beberapa spektra menunjukkan kedekatan hasil antara spektra sampel dengan spektra standar yaitu 413,00 nm dan 412,00 nm. Hal ini menunjukkan bahwa dalam sampel mengandung flavonoid sehingga metode analisis memiliki spesifisitas yang baik dalam pengukuran.

### **6.3.4 Akurasi**

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

Uji akurasi dilakukan untuk memperoleh nilai persen perolehan kembali atau % *recovery* analit dalam matriks dan sampel. Pengujian akurasi dilakukan dengan metode *standard addition method* yaitu menganalisis larutan standar dan sampel dengan 3 konsentrasi yang berbeda yaitu 80%, 100%, dan 120%. Masing-masing direplikasi 3 kali. Hasil uji akurasi diukur kadarnya dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi  $y = 0,0049x + 0,0889$  dengan  $r = 0,9934$ , hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4.

Nilai akurasi dengan metode *standard addition method* didapatkan rata-rata nilai % *recovery* sebesar 100,0032%, 99,82766%, dan 103,7059%. Nilai tersebut memenuhi persyaratan % *recovery* yaitu 80-110%.

### **6.3.5 Presisi**

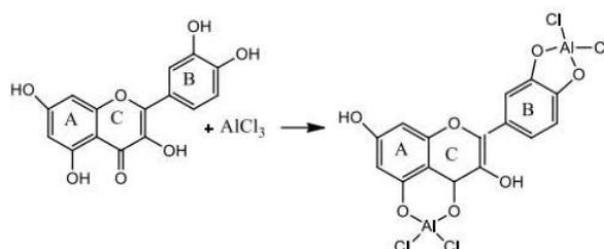
Presisi atau *precision* adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). *Precision* dapat dinyatakan sebagai *repeatability* (keterulangan) atau *reproducibility* (ketertiruan). *Repeatability* adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek.

Penentuan *repeatability* dilakukan dengan cara menganalisis tiga konsentrasi pada akurasi dengan mereplikasi 6 kali. Penentuan presisi dilakukan dengan menganalisis larutan *standard addition method* dengan konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Nilai presisi dihitung menggunakan standar deviasi (SD) untuk

menghasilkan *Relative Standard Deviation* (RSD). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan nilai  $\%RSD \leq 1,5\%$ . Semakin kecil nilai standar deviasi yang diperoleh, maka semakin kecil pula nilai koefisien variasinya. Hasil uji presisi diukur kadarnya dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi  $y = 0,0049x + 0,0889$  dengan  $r = 0,9934$ . Uji presisi menggunakan metode *repeatability* menghasilkan  $\%RSD$  masing-masing 0,304555%, 0,779661%, dan 0,487851%. Uji presisi dengan metode *repeatability* memenuhi syarat  $\%RSD \leq 1,5\%$ .

#### 6.4 Penetapan Kadar Flavonoid Total Biji Kopi Robusta

Analisis kadar flavonoid total merupakan pengukuran total flavonoid yang terkandung di dalam sampel. Pereaksi  $AlCl_3$  digunakan untuk mendeteksi gugus hidroksi dan keto yang bertetangga dan gugus orto-hidroksi.  $AlCl_3$  menyebabkan terjadinya pergeseran spektrum ultraviolet pada flavonoid. Standar yang digunakan adalah kuersetin, karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga (Azizah et al., 2014).



Gambar 6.1 Pembentukan Senyawa Kompleks Kuersetin dan  $AlCl_3$

Persyaratan standar flavonoid yang digunakan adalah harus mengandung gugus hidroksi pada posisi karbon ketiga, ikatan rangkap ganda antara karbon posisi dua dan tiga, gugus karbonil pada posisi karbon keempat dan gugus polihidroksi

pada dua cincin aromatik (Sari et al., 2021). Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan pada rentang panjang gelombang 400-500 nm. Panjang gelombang maksimum kuersetin hasil pengukuran adalah pada panjang gelombang 413 nm. Panjang gelombang maksimum tersebut digunakan untuk menentukan kurva seri kuersetin dan kadar flavonoid total pada sampel ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Pada penentuan kurva baku kuersetin, dibuat kuersetin dengan seri konsentrasi 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm. Kurva kalibrasi digunakan untuk mencapai ketelusuran pengukuran, menentukan kebenaran nilai yang ditunjukkan instrumen dan sampel yang diukur. Kurva kalibrasi diperoleh dengan membuat larutan standar kuersetin dengan tujuan untuk mengukur tingkat ketelitian data yang diperoleh (Sari et al., 2021). Hasil yang didapat dari pembuatan kurva kalibrasi adalah persamaan regresi linier  $y = 0,0056x + 0,0526$  dengan nilai  $r = 0,9923$ . Besarnya linearitas ini mendekati nilai satu, sehingga dapat dikatakan bahwa absorbansi merupakan fungsi yang besarnya berbanding lurus dengan konsentrasi dan mengikuti persamaan regresi linier. Penetapan kadar flavonoid total dilakukan terhadap ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Metode yang digunakan adalah metode kolorimetri.  $AlCl_3$  berfungsi membentuk kompleks dengan orto hidroksi maupun hidroksi keton, sementara penambahan natrium asetat dimaksudkan untuk menguraikan kembali kompleks karena Al tidak stabil pada orto hidroksi dan hidroksi keton (Sari et al., 2021). Pada penetapan kadar flavonoid, penambahan natrium asetat adalah untuk mendeteksi adanya gugus 7-hidroksil sedangkan perlakuan inkubasi selama 20 menit yang dilakukan sebelum pengukuran dimaksudkan agar reaksi berjalan sempurna, sehingga memberikan

intensitas warna yang maksimal (Azizah et al., 2014). Penetapan kadar flavonoid total dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva baku kuersetin. Pada penelitian ini menghasilkan rata-rata kadar flavonoid total sebesar 19,935 mg/QE/g.

## **BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN**

### **7.1 Kesimpulan**

1. Ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) mengandung senyawa kimia flavonoid.
2. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 413 nm. Diperoleh *operating time* pada menit ke-20 dengan besar absorbansi 0,402. Konsentrasi optimum standar kuersetin dan sampel ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yaitu pada konsentrasi 50 ppm. Validasi metode analisis memiliki validitas yang baik dan memenuhi parameter spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, dan *limit of detection* dan *limit of quantitation*
3. Hasil uji penetapan kadar flavonoid menunjukkan ekstrak etanol biji kopi sebesar 19,935 mg/QE/g ekstrak.

### **7.2 Saran**

1. Perlu dilakukan identifikasi, optimasi, dan validasi metode analisis penetapan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan metode lain seperti KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang penetapan kadar senyawa kimia lain seperti alkaloid, saponin, tanin, terpenoid, steroid pada ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*).

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A. R., Juwita, Ratulangi, S. A. D., dan Malik, A. (2015). Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Metanol Buah dan Daun Patikala (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.SM). *Pharm Sci Res.* 2(1). 1-10.
- Alwi, H. (2017). *Validasi Metode Analisis Flavonoid Dari Ekstrak Etanol Kasumba Turate (Carthamus tinctorius L.) Secara Spektrofotometri UV-Vis.* December.
- Aminah, A., Tomayahu, N., & Abidin, Z. (2017). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(2), 226–230. <https://doi.org/10.33096/jffi.v4i2.265>
- Anonim. (1979). *Farmakope Indonesia Edisi Ketiga*. Jakarta Pusat: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Anonim. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta Pusat: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Arikalang, G. T., Sudewi, S., & Rorong, J. A. (2018). Optimasi Dan Validasi Metode Analisis Dalam Penentuan Kandungan Total Fenolik Pada Ekstrak Daun gedi Hijau (*Abelmoschus manihot* L.) Yang Diukur Dengan Spektrofotometer UV-VIS. *PHARMACONJurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*, 7(3), 14–21.
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., & Faramayuda, F. (2014). Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl<sub>3</sub> Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2). <https://doi.org/10.26874/kjif.v2i2.14>
- Beksono, H. R. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Dengan Metode DPPH. *Skripsi*. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Dewi, I. S., Saptawati, T., & Rachma, F. A. (2021). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit dan Biji Terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.) Phytochemical Screening of Tamarillo Peel and Seeds Ethanol Extracts (*Solanum Betaceum* Cav.). *Prosiding Seminar Nasional UNIMUS*, 4, 1210–1218.

- Frida, F. (2018). Perbandingan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) Pada Dua Tempat Tumbuh. *Skripsi*. Program Studi Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim. Semarang.
- Hasbullah, U.H.A, dkk. (2021). *Kopi Indonesia*. Yayasan Kita Menulis.
- Khopkar, S. M. (2003). *Konsep Dasar Kimia Analitik, Terjemahan A. Saptorahardjo, Edisi pertama*. Jakarta: UI Press.
- Kristanti, A.N., dkk. (2008). *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kumalasari, E., Nazir, M. A., & Putra, A. M. P. (2018). Determination of Total Flavonoid Content of 70% Ethanol Extract of Dayak Leeks (*Eleutherine palmifolia* L.) Using UV-VIS Spectrophotometric Method. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 1(2), 201–209.
- Marjoni, Riza. (2016). *Dasar-Dasar Fitokimia Untuk Diploma III Farmasi*. Jakarta: Trans Info Media.
- Misdram, M., & Cahyono, A. (2021). Optimasi Komposisi Makanan untuk Penderita Anemia Menggunakan Metode Variable Neighborhood Search. *Jurnal Spirit*, 13(1), 28–34.
- Murtafiah, A. (2012). Daya Hambat Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) terhadap *Streptococcus mutans* (Penelitian Eksperimental Laboratoris). *Skripsi*. Program Studi Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Jember.
- Nada, F. A. Q., Rahayu, T., & Hayati, A. (2021). Phytochemical screening analysis and antioxidant activity of robusta coffee roasted seeds (*Coffea canephora*) extract from organic and inorganic fertilized plants. *Jurnal Ilmiah SAINS ALAMI (Known Nature)*, 3(2), 31–39.
- Najiyati S, & Danarti. (2012). *Kopi, Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: PT. Penebar Swadaya.
- Noviyanto, Fajrin. (2020). *Penetapan Kadar Ketoprofen dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis*. Bandung: Media Sains Indonesia.

- Pertiwi, N. P. (2015). Validasi Metode Dan Penetapan Kadar Asam Klorogenat Pada Ekstrak Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Dengan Metode KLT Densitometri. *Skripsi*. Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jember. Jember.
- Rahardjo, Pudji. (2012). *KOPI Panduan Budi Daya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rahardjo, Pudji. (2017). *Berkebun Kopi*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rasyid, R., Sanjaya, W. F., & Zulharmita, Z. (2013). Penetapan Kadar Kofein Daun Kopi Kawa (*Coffea Robusta*, Lind). *Jurnal Farmasi Higea*, 5(2).
- Riyanto. (2017). *Validasi & Verifikasi Metode Uji Sesuai Dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*. Yogyakarta: Deepublish.
- Rohmah, S. A. A., Muadifah, A., & Martha, R. D. (2021). Validasi Metode Penetapan Kadar Pengawet Natrium Benzoat pada Sari Kedelai di Beberapa Kecamatan di Kabupaten Tulungagung Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 3(2), 120–127. <https://doi.org/10.25026/jsk.v3i2.265>
- Rohman, Abdul. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Romadhani, H. (2016). Validasi Metode Penetapan Kadar Tablet Floating Metformin Hidroklorida dengan Spektrofotometri. *Skripsi*. Purwokerto: Universitas Muhammadiyah Purwokerto.
- Saifudin, Aziz. (2014). *Senyawa Alam Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: Deepublish.
- Sani K, Fathnur. (2018). *Metodologi Penelitian Farmasi Komunitas dan Eksperimental Dilengkapi Dengan Analisis Data Program SPSS*. Yogyakarta: Deepublish.
- Sari, D. Y., R, W., & AN, T. (2021). Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Jamur Susu Harimau (*Lignosus rhinocerus*). *Jurnal Farmasi Udayana*, 10(1), 23–30. <https://doi.org/10.24843/jfu.2021.v10.i01.p03>
- Sholihah, D. C. H., Aji, J. M. M., & Kuntadi, E. B. (2015). Analisis Perwilayahn Komoditas Dan Kontribusi Subsektor Perkebunan Kopi Rakyat Di Kabupaten

Jember. *Berkala Ilmiah Pertanian*, 1(2), 1–9.

Sugrani, A., Wagner, H. (2009). *Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography Atlas*, second Edition, 1-365. Springer.

Suhendi, A., Sjahid, L. A., Hanwar, D. (2011). Isolasi dan Identifikasi Flavonoid Dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.). *Pharmakon*, 12(2).

Sukmawati, Sudewi, S., & Pontoh, J. (2018). Optimasi Dan Validasi Metode Analisa Dalam Penentuan Kandungan Total Flavonoid Pada Ekstrak Daun Gedi Hijau (*Abelmoscus manihot* L.) Yang Diukur Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *Pharmakon*, 7(3), 32–41.

Sulasmi, E. S., Faiqohtun Wuriana, Z., Sapta Sari, M., & Suhadi, S. (2018). Analisis Kualitatif Kandungan Senyawa Aktif (Flavonoid, Alkaloid, Polifenol, Saponin, Terpenoid dan Tanin) pada Ekstrak Metanol Daun dan Rhizoma *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching di Taman Nasional Baluran. *Universitas Negeri Malang. Prosiding Seminar Nasional VI Hayati 2018, September*, 121–128.

Suranny L. E., & Wagino. (2019). Pengembangan Potensi Kopi Ndorog Wonogiri Menjadi Komoditas Unggulan yang Berkelanjutan. *Jurnal INISIASI*, 8(2), 77-84.

Ulfa, A. M., Winahyu, D. A., & Resmawati. (2017). *Validasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Pada Pemisahan Anbroxol HCl Dalam Sediaan Obat Sirup Merek X*. 5(1), 214–220.

Wardaningrum, R. Y. (2020). Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Terpurifikasi Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas. L*) Dengan Vitamin E. *Skripsi. Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Ngudi Walyo. Ungaran*.

Wigati, E. I., Pratiwi, E., Nissa, T. F., & Utami, N. F. (2018). Uji Karakteristik Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre) Dari Bogor, Bandung Dan Garut Dengan Metode Dpph (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*). *Fitofarmaka Jurnal Ilmiah Farmasi*, 8(1), 59-66. <https://doi.org/10.33751/jf.v8i1.1172>

Winarno, S.T. & Darsono. (2019). *Ekonomi Kopi Rakyat Robusta di Jawa Timur. Ponorogo: Uwais Inspirasi Indonesia*.

- Wisudyarningsih, B. (2012). Studi Preformulasi: Validasi Metode Spektrofotometri Ofloksasin Dalam Larutan Dapar Fosfat. *Stomatognatic*, 9(2), 77–81.
- Wulandari, A., Rustiani E., Noorlaela E., & Agustina, P. (2019). Formulasi Ekstraksi dan Biji Kopi Robusta dalam Sediaan Masker Gel Peel Off untuk Meningkatkan Kelembapan dan Kehalusan Kulit. *Fitofarmaka Jurnal Ilmiah Farmasi*, 9(2), 77-85.
- Yeti, A., & Rafita, Y. (2021). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Herba Rumput Bambu (*Lopatherum gracile* Brongn.) Dengan Metode Spektrofotometri Visible. *FARMASAINKES*, 1(1), 11–19.
- Yuliana, E. R., Sari, M. P., & Febriyanti, R. (2021). Formulasi Dan Uji Stabilitas Fisik Lulur Tradisional Dari Pemanfaatan Limbah Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Dan Ampas Kopi (*Coffea* sp.). *Jurnal Ilmiah Farmasi*.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Hasil Determinasi Biji Kopi Robusta

Kode Dokumen : FR-AUK-064  
Revisi : 0



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

#### SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

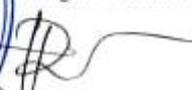
No: 101/PL17.8/PG/2022

Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi S1 Farmasi No: 1545/FIKES.UDS/U/VI/2022 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Rizka Ilmiana  
NIM : 18040089  
Jur/Fak/PT : Prodi S1 Farmasi/ Universitas dr. Soebandi

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

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 15 Juni 2022  
K.a. UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu  
  
Ir. Budi Prasetyo, S.Pt, MP, IPM  
NIP. 197106212001121001

**Lampiran 2.** Rendemen Ekstrak Etanol 70% Biji Kopi Robusta

Berat serbuk simplisia → 300 gram

Volume etanol 70% → 3000 mL / 3 Liter

Berat ekstrak etanol → 57,14 gram

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak etanol}}{\text{Berat serbuk simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{57,14 \text{ gram}}{300 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 19,04\%\end{aligned}$$

**Lampiran 3. Hasil Skrining Fitokimia Flavonoid**

#### Lampiran 4. Pengenceran Optimasi Metode Analisis

##### A. Larutan induk standar kuersetin 1000 ppm

$$\text{Teori} \quad \rightarrow \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 = 1000 \text{ ppm}$$

$$\text{Analisis} \quad \rightarrow \frac{10,6 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 = 1060 \text{ ppm}$$

##### Pengenceran larutan induk standar kuersetin 1000 ppm

###### Teori

1) 10 ppm

$$1000 \text{ ppm} \cdot v_1 = 10 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$v_1 = \frac{100}{1000}$$

$$v_1 = 0,1 \text{ mL}$$

2) 20 ppm

$$1000 \text{ ppm} \cdot v_1 = 20 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$v_1 = \frac{200}{1000}$$

$$v_1 = 0,2 \text{ mL}$$

3) 30 ppm

$$1000 \text{ ppm} \cdot v_1 = 30 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$v_1 = \frac{300}{1000}$$

$$v_1 = 0,3 \text{ mL}$$

4) 40 ppm

$$1000 \text{ ppm} \cdot v_1 = 40 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$v_1 = \frac{400}{1000}$$

$$v_1 = 0,4 \text{ mL}$$

5) 50 ppm

$$1000 \text{ ppm} \cdot v_1 = 50 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$v_1 = \frac{500}{1000}$$

$$v_1 = 0,5 \text{ mL}$$

6) 60 ppm

$$1000 \text{ ppm} \cdot v_1 = 60 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$v_1 = \frac{600}{1000}$$

$$v_1 = 0,6 \text{ mL}$$

7) 70 ppm

$$1000 \text{ ppm} \cdot v_1 = 70 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$v_1 = \frac{700}{1000}$$

$$v_1 = 0,7 \text{ mL}$$

8) 80 ppm

$$1000 \text{ ppm} \cdot v_1 = 80 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$v_1 = \frac{800}{1000}$$

$$v_1 = 0,8 \text{ mL}$$

9) 90 ppm

$$1000 \text{ ppm} \cdot v_1 = 90 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$v_1 = \frac{900}{1000}$$

$$v_1 = 0,9 \text{ mL}$$

10) 100 ppm

$$1000 \text{ ppm} \cdot v_1 = 100 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$v_1 = \frac{1000}{1000}$$

$$v_1 = 1 \text{ mL}$$

###### Analisis

1) 10,6 ppm

$$1060 \text{ ppm} \cdot 0,1 \text{ mL} = m_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$m_2 = \frac{106}{10}$$

$$m_2 = 10,6 \text{ ppm}$$

2) 21,2 ppm

$$1060 \text{ ppm} \cdot 0,2 \text{ mL} = m_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$m_2 = \frac{212}{10}$$

$$m_2 = 21,2 \text{ mL}$$

3) 31,8 ppm

$$1060 \text{ ppm} \cdot 0,3 \text{ mL} = m_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$m_2 = \frac{318}{10}$$

$$m_2 = 31,8 \text{ mL}$$

4) 42,4 ppm

$$1060 \text{ ppm} \cdot 0,4 \text{ mL} = m_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$m_2 = \frac{424}{10}$$

$$m_2 = 42,4 \text{ mL}$$

5) 53 ppm

$$1060 \text{ ppm} \cdot 0,5 \text{ mL} = m_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$m_2 = \frac{530}{10}$$

$$m_2 = 53 \text{ mL}$$

6) 63,6 ppm

$$1060 \text{ ppm} \cdot 0,6 \text{ mL} = m_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$m_2 = \frac{636}{10}$$

$$m_2 = 63,6 \text{ mL}$$

7) 74,2 ppm

$$1060 \text{ ppm} \cdot 0,7 \text{ mL} = m_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$m_2 = \frac{742}{10}$$

$$m_2 = 74,2 \text{ mL}$$

8) 84,8 ppm

$$1060 \text{ ppm} \cdot 0,8 \text{ mL} = m_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$m_2 = \frac{848}{10}$$

$$m_2 = 84,8 \text{ mL}$$

9) 95,4 ppm

$$1060 \text{ ppm} \cdot 0,9 \text{ mL} = m_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$m_2 = \frac{954}{10}$$

$$m_2 = 95,4 \text{ mL}$$

10) 106 ppm

$$1060 \text{ ppm} \cdot 1 \text{ mL} = m_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$m_2 = \frac{1060}{10}$$

$$m_2 = 106 \text{ mL}$$

**B. Larutan induk sampel ekstrak etanol biji kopi robusta 1000 ppm**

$$\text{Teori} \quad \rightarrow \frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 = 1000 \text{ ppm}$$

$$\text{Analisis} \quad \rightarrow \frac{25,5 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 = 1020 \text{ ppm}$$

**Pengenceran larutan induk sampel ekstrak etanol biji kopi robusta 1000 ppm****Teori**

- |   |   |
|---|---|
| 1) 10 ppm   | $v_1 = \frac{300}{1000}$                              |
| 1000 ppm . $v_1 = 10 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$ | $v_1 = 0,3 \text{ mL}$                                |
| $v_1 = \frac{100}{1000}$                              |   |
| $v_1 = 0,1 \text{ mL}$                                | 4) 40 ppm   |
|   | 1000 ppm . $v_1 = 40 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$ |
| 2) 20 ppm   | $v_1 = \frac{400}{1000}$                              |
| 1000 ppm . $v_1 = 20 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$ | $v_1 = 0,4 \text{ mL}$                                |
| $v_1 = \frac{200}{1000}$                              |   |
| $v_1 = 0,2 \text{ mL}$                                | 5) 50 ppm   |
| 3) 30 ppm   | 1000 ppm . $v_1 = 50 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$ |
| 1000 ppm . $v_1 = 30 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$ | $v_1 = \frac{500}{1000}$                              |
|   | $v_1 = 0,5 \text{ mL}$                                |

**Analisis**

- |   |   |
|---|---|
| 1) 10,2 ppm                                   |   |
| 1020 ppm . 0,1 mL = $m_2 \cdot 10 \text{ mL}$ | 5) 51 ppm                                     |
| $m_2 = \frac{102}{10}$                        | 1020 ppm . 0,5 mL = $m_2 \cdot 10 \text{ mL}$ |
| $m_2 = 10,2 \text{ mL}$                       | $m_2 = \frac{510}{10}$                        |
| 2) 61,2 ppm                                   | $m_2 = 51 \text{ mL}$                         |
| 1020 ppm . 0,2 mL = $m_2 \cdot 10 \text{ mL}$ |   |
| $m_2 = \frac{204}{10}$                        |   |
| $m_2 = 20,2 \text{ mL}$                       |   |
| 3) 30,6 ppm                                   |   |
| 1020 ppm . 0,3 mL = $m_2 \cdot 10 \text{ mL}$ |   |
| $m_2 = \frac{306}{10}$                        |   |
| $m_2 = 30,6 \text{ mL}$                       |   |
| 4) 40,8 ppm                                   |   |
| 1020 ppm . 0,4 mL = $m_2 \cdot 10 \text{ mL}$ |   |
| $m_2 = \frac{408}{10}$                        |   |
| $m_2 = 40,8 \text{ mL}$                       |   |

## Lampiran 5. Perhitungan Validasi Metode Analisis

### A. Linieritas, LOD & LOQ

#### Perhitungan Parameter Linieritas, LOD& LOQ

No	Konsentrasi (x)	Absorbansi (y)	y'	y'-y	(y'-y) <sup>2</sup>
1	10,6 ppm	0,135	0,1408	0,0058	0,00003364
2	21,2 ppm	0,207	0,1927	-0,0143	0,00020449
3	31,8 ppm	0,245	0,2447	-0,0003	9E-08
4	42,4 ppm	0,306	0,2967	-0,0093	8,649E-05
5	53 ppm	0,339	0,3486	0,0096	9,216E-05
6	63,6 ppm	0,402	0,4005	-0,0015	0,00000225
7	74,2 ppm	0,438	0,4525	0,0145	0,00021025
8	84,8 ppm	0,504	0,5044	0,0004	1,6E-07
9	95,4 ppm	0,542	0,5564	0,0144	0,00020736
10	106 ppm	0,634	0,6083	-0,0257	0,00066049
<b>Jumlah</b>	583 ppm				0,00149738

#### Regresi

$$a = 0,0889$$

$$y = 0,0049x + 0,0889$$

$$b = 0,0049$$

$$r = 0,9934$$

**1) 10 ppm**

$$y' = 0,0049x + 0,0889$$

$$y' = 0,0049 (10,6) + 0,0889$$

$$y' = 0,0519 + 0,0889$$

$$y' = 0,1408$$

**2) 20 ppm**

$$y' = 0,0049x + 0,0889$$

$$y' = 0,0049 (21,2) + 0,0889$$

$$y' = 0,1038 + 0,0889$$

$$y' = 0,1927$$

**3) 30 ppm**

$$y' = 0,0049x + 0,0889$$

$$y' = 0,0049 (31,8) + 0,0889$$

$$y' = 0,1558 + 0,0889$$

$$y' = 0,2447$$

**4) 40 ppm**

$$y' = 0,0049x + 0,0889$$

$$y' = 0,0049 (42,4) + 0,0889$$

$$y' = 0,2078 + 0,0889$$

$$y' = 0,2967$$

**5) 50 ppm**

$$y' = 0,0049x + 0,0889$$

$$y' = 0,0049 (53) + 0,0889$$

$$y' = 0,2597 + 0,0889$$

$$y' = 0,3486$$

**6) 60 ppm**

$$y' = 0,0049x + 0,0889$$

$$y' = 0,0049 (63,6) + 0,0889$$

$$y' = 0,3116 + 0,0889$$

$$y' = 0,4005$$

**7) 70 ppm**

$$y' = 0,0049x + 0,0889$$

$$y' = 0,0049 (74,2) + 0,0889$$

$$y' = 0,3636 + 0,0889$$

$$y' = 0,4525$$

**8) 80 ppm**

$$y' = 0,0049x + 0,0889$$

$$y' = 0,0049 (84,8) + 0,0889$$

$$y' = 0,4155 + 0,0889$$

$$y' = 0,5044$$

**9) 90 ppm**

$$y' = 0,0049x + 0,0889$$

$$y' = 0,0049 (95,4) + 0,0889$$

$$y' = 0,4675 + 0,0889$$

$$y' = 0,5564$$

**10) 100 ppm**

$$y' = 0,0049x + 0,0889$$

$$y' = 0,0049 (106) + 0,0889$$

$$y' = 0,5194 + 0,0889$$

$$y' = 0,6083$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y' - y)^2}{N-2}} = \sqrt{\frac{0,00149738}{10-2}} = \sqrt{\frac{0,00149738}{8}} = \sqrt{0,00018717} = 0,013681$$

$$S_{x0} = \frac{S_{y/x}}{b} = \frac{0,013681}{0,0049} = 2,792061$$

$$\bar{x} = \frac{10,6+21,2+31,8+42,4+53+63,6+74,2+84,8+95,4+106}{10} = \frac{853}{10} = 85,3$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{\bar{x}} \times 100 \% = \frac{2,792061}{85,3} \times 100 \% = 3,273225\%$$

$$LOD = \frac{3 \cdot S_{y/x}}{b} = \frac{3 \cdot 0,013681}{0,0049} = 8,376184 \text{ ppm}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b} = \frac{10 \cdot 0,013681}{0,0049} = 27,92061 \text{ ppm}$$

## B. Akurasi dan Presisi

### 1. Larutan induk standar dan sampel

Standar

$$\text{Teori} \quad \rightarrow \frac{20 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} \times 1000 = 200 \text{ ppm}$$

$$\text{Analisis} \quad \rightarrow \frac{21 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} \times 1000 = 210 \text{ ppm}$$

Sampel

$$\text{Teori} \quad \rightarrow \frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 = 1000 \text{ ppm}$$

$$\text{Analisis} \quad \rightarrow \frac{25,2 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 = 1008 \text{ ppm}$$

Pengenceran sampel 50 ppm

$$\begin{aligned} \text{Teori} \quad \rightarrow 50 \text{ ppm} &= \frac{\text{mL}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \\ &= 1,25 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\text{Analisis} \quad \rightarrow 50,4 \text{ ppm} = \frac{1,25 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \times 1008$$

### 2. Preparasi larutan standar adisi

#### a) Adisi 80%

Hasil optimasi konsentrasi standar kuersetin = 50 ppm

$$\text{Standar 80\%} = \frac{80}{100} \times 50 \text{ ppm} = 40 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{40 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}} = 20 \text{ mL}$$

#### b) Adisi 100%

Hasil optimasi konsentrasi standar kuersetin = 50 ppm

$$\text{Standar 100\%} = \frac{100}{100} \times 50 \text{ ppm} = 50 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{50 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}} = 25 \text{ mL}$$

c) Adisi 120%

Hasil optimasi konsentrasi standar kuersetin = 50 ppm

$$\text{Standar 120\%} = \frac{120}{100} \times 50 \text{ ppm} = 60 \text{ ppm}$$

$$v_1 = \frac{60 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{200 \text{ ppm}} = 30 \text{ mL}$$

<b>Preparasi Akurasi dan Presisi</b>	
<b>Larutan standar induk 200 ppm = 20 mg/100 mL</b>	
40 ppm	$m_2 = \frac{20 \text{ mL} \times 210 \text{ ppm}}{100 \text{ mL}} = 42 \text{ ppm}$
50 ppm	$m_2 = \frac{25 \text{ mL} \times 210 \text{ ppm}}{100 \text{ mL}} = 52,5 \text{ ppm}$
60 ppm	$m_2 = \frac{30 \text{ mL} \times 210 \text{ ppm}}{100 \text{ mL}} = 63 \text{ ppm}$

a. Perhitungan kadar dalam pengujian akurasi

▪ Adisi 80%

$$x_1 = \frac{0,542 - 0,0889}{0,0049} = 92,46939 \text{ ppm}$$

$$x_2 = \frac{0,543 - 0,0889}{0,0049} = 92,67347 \text{ ppm}$$

$$x_3 = \frac{0,540 - 0,0889}{0,0049} = 92,06122 \text{ ppm}$$

▪ Adisi 100%

$$x_1 = \frac{0,592 - 0,0889}{0,0049} = 102,6735 \text{ ppm}$$

$$x_2 = \frac{0,588 - 0,0889}{0,0049} = 101,8571 \text{ ppm}$$

$$x_3 = \frac{0,598 - 0,0889}{0,0049} = 103,898 \text{ ppm}$$

▪ Adisi 120%

$$x_1 = \frac{0,657 - 0,0889}{0,0049} = 115,9388 \text{ ppm}$$

$$x_2 = \frac{0,657 - 0,0889}{0,0049} = 115,9388 \text{ ppm}$$

$$x_3 = \frac{0,654 - 0,0889}{0,0049} = 115,3265 \text{ ppm}$$

## b. Perhitungan % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(Cf - Cu)}{Ca} \times 100\%$$

## ▪ Adisi 80%

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(92,46939 - 50,4)}{42} \times 100\% = 100,1652\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(92,67347 - 50,4)}{42} \times 100\% = 100,6511\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(92,06122 - 50,4)}{42} \times 100\% = 99,19339\%$$

## ▪ Adisi 100%

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(102,6735 - 50,4)}{52,5} \times 100\% = 99,56851\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(101,8571 - 50,4)}{52,5} \times 100\% = 98,01361\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(103,898 - 50,4)}{52,5} \times 100\% = 101,9009\%$$

## ▪ Adisi 120%

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(115,9388 - 50,4)}{63} \times 100\% = 104,0298\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(115,9388 - 50,4)}{63} \times 100\% = 104,0298\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(115,3265 - 50,4)}{63} \times 100\% = 103,058\%$$

## c. Perhitungan standar deviasi

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

## ▪ Adisi 80%

$$SD = \sqrt{\frac{1,101834}{3-1}} = 0,742238$$

- Adisi 100%

$$SD = \sqrt{\frac{7,65617}{3-1}} = 1,956549$$

- Adisi 120%

$$SD = \sqrt{\frac{0,629619}{3-1}} = 0,561079$$

d. Perhitungan standar deviasi relatif

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

- Adisi 80%

$$\%RSD = \frac{0,742238}{100,0032} \times 100\% = 0,742214\%$$

- Adisi 100%

$$\%RSD = \frac{1,956549}{99,82766} \times 100\% = 1,959927\%$$

- Adisi 120%

$$\%RSD = \frac{0,561079}{103,7059} \times 100\% = 0,541029\%$$

e. Perhitungan kadar dalam pengujian presisi

- Adisi 80%

$$x_1 = \frac{0,542-0,0889}{0,0049} = 92,46939 \text{ ppm}$$

$$x_2 = \frac{0,543-0,0889}{0,0049} = 92,67347 \text{ ppm}$$

$$x_3 = \frac{0,540-0,0889}{0,0049} = 92,06122 \text{ ppm}$$

$$x_4 = \frac{0,541-0,1547}{0,0193} = 92,26531 \text{ ppm}$$

$$x_5 = \frac{0,540-0,1547}{0,0193} = 92,06122 \text{ ppm}$$

$$x_6 = \frac{0,543-0,1547}{0,0193} = 92,67347 \text{ ppm}$$

- Adisi 100%

$$x_1 = \frac{0,592-0,0889}{0,0049} = 102,6735 \text{ ppm}$$

$$x_2 = \frac{0,588-0,0889}{0,0049} = 101,8571 \text{ ppm}$$

$$x_3 = \frac{0,598-0,0889}{0,0049} = 103,898 \text{ ppm}$$

$$x_4 = \frac{0,596-0,1547}{0,0193} = 103,4898 \text{ ppm}$$

$$x_5 = \frac{0,590-0,1547}{0,0193} = 102,2653 \text{ ppm}$$

$$x_6 = \frac{0,6596-0,1547}{0,0193} = 103,4898 \text{ ppm}$$

- Adisi 120%

$$x_1 = \frac{0,657-0,0889}{0,0049} = 115,9388 \text{ ppm}$$

$$x_2 = \frac{0,657-0,0889}{0,0049} = 115,9388 \text{ ppm}$$

$$x_3 = \frac{0,654-0,0889}{0,0049} = 115,3265 \text{ ppm}$$

$$x_4 = \frac{0,650-0,1547}{0,0193} = 114,5102 \text{ ppm}$$

$$x_5 = \frac{0,654-0,1547}{0,0193} = 115,3265 \text{ ppm}$$

$$x_6 = \frac{0,652-0,1547}{0,0193} = 114,9184 \text{ ppm}$$

f. Perhitungan standar deviasi

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

- Adisi 80%

$$SD = \sqrt{\frac{0,395674}{6-1}} = 0,281309$$

- Adisi 100%

$$SD = \sqrt{\frac{3,221052}{6-1}} = 0,802627$$

- Adisi 120%

$$SD = \sqrt{\frac{1,582714}{6-1}} = 0,562621$$

g. Perhitungan standar deviasi relatif

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

- Adisi 80%

$$\%RSD = \frac{0,281309}{92,36735} \times 100\% = 0,304555\%$$

- Adisi 100%

$$\%RSD = \frac{0,802627}{102,9456} \times 100\% = 0,779661\%$$

- Adisi 120%

$$\%RSD = \frac{0,562621}{115,3265} \times 100\% = 0,487851\%$$

**Lampiran 6.** Perhitungan Kadar Flavonoid Total

Replikasi	Penimbangan (mg)	Absorbansi
1	25,1	0,333
2	25,6	0,340
3	25,4	0,335

## 1) Replikasi 1

$$y = 0,0056x + 0,0526$$

$$0,333 = 0,0056x + 0,0526$$

$$x = \frac{0,333 - 0,0526}{0,0056}$$

$$x = 50,0714 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar} &= \frac{C \times V \times Fp}{W} \\ &= \frac{50,0714 \times 25 \text{ mL} \times 10}{25,1 \text{ mg}} \\ &= 498,719 \text{ } \mu\text{g/mg} \rightarrow 0,4987 \text{ mg/g} \end{aligned}$$

$$\text{Ppm} = \frac{0,4987}{25} \times 1000 = 19,948 \text{ ppm}$$

## 2) Replikasi 2

$$y = 0,0056x + 0,0526$$

$$0,340 = 0,0056x + 0,0526$$

$$x = \frac{0,340 - 0,0526}{0,0056}$$

$$x = 51,3214 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar} &= \frac{C \times V \times Fp}{W} \\ &= \frac{51,3214 \times 25 \text{ mL} \times 10}{25,6 \text{ mg}} \\ &= 501,185 \text{ } \mu\text{g/mg} \rightarrow 0,5011 \text{ mg/g} \end{aligned}$$

$$\text{Ppm} = \frac{0,5011}{25} \times 1000 = 20,004 \text{ ppm}$$

## 3) Replikasi 3

$$y = 0,0056x + 0,0526$$

$$0,335 = 0,0056x + 0,0526$$

$$x = \frac{0,335 - 0,0526}{0,0056}$$

$$x = 50,4285 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar} &= \frac{C \times V \times Fp}{W} \\ &= \frac{50,4285 \times 25 \text{ mL} \times 10}{25,4 \text{ mg}} \\ &= 496,343 \text{ } \mu\text{g/mg} \rightarrow 0,4963 \text{ mg/g} \end{aligned}$$

$$\text{Ppm} = \frac{0,4963}{25} \times 1000 = 19,852 \text{ ppm}$$

$$\text{Rata-rata kadar } (\bar{x}) = \frac{19,948 + 20,004 + 19,852}{3} = \frac{59,804}{3} = 19,935 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \sqrt{\frac{\sum (P-Pr)^2}{n-1}} \\ &= \sqrt{\frac{(19,948-19,935)^2 + (20,004-19,935)^2 + (19,852-19,935)^2}{3-1}} \\ &= \sqrt{\frac{0,0001 + 0,0047 + 0,0068}{2}} = \sqrt{0,0116} = 0,1077 \end{aligned}$$

$$\text{RSD} = \frac{0,1077}{19,935} \times 100\% = 0,54\%$$

$$\text{Rata-rata kadar} - \text{SD} \rightarrow 19,935 - 0,1077$$

$$19,8273 \text{ ppm}$$

$$\text{Rata-rata kadar} + \text{SD} \rightarrow 19,935 + 0,1077$$

$$20,0427 \text{ ppm}$$

**Lampiran 7. Daftar Riwayat Hidup**

Nama : Rikza Ilmiana  
Tempat, Tanggal Lahir : Jember, 16 Februari 2000  
Jenis Kelamin : Perempuan  
Agama : Islam  
Alamat : Dusun Krajan RT 001 RW 005 Desa Manggisan  
Kecamatan Tanggul Kabupaten Jember Jawa  
Timur

**Pendidikan Formal**

Tahun 2018-2022 : S1 Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember  
Tahun 2015-2018 : SMA Negeri 2 Tanggul  
Tahun 2012-2015 : SMP Negeri 4 Tanggul  
Tahun 2006-2012 : SD Negeri Manggisan 01  
Tahun 2004-2006 : TK. Pertiwi

## Lampiran 8. Lembar Konsultasi Proposal Skripsi



## UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

FAKULTAS ILMU KESEHATAN DAN FAKULTAS EKONOMI DAN BISNIS  
 Jl. Dr. Soebandi No. 99 Jember, Telp/Fax: (0331) 483536,  
 E-mail : [info@ihsf.soebandi.ac.id](mailto:info@ihsf.soebandi.ac.id) <http://www.abikendrasoebandi.ac.id>

### LEMBAR KONSULTASI PEMBIMBINGAN PROPOSAL SKRIPSI/TUGAS AKHIR PROGRAM STUDI FARMASI UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

Nama Mahasiswa : Rikza Ilmiana

NIM : 18040089

Judul : Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis Untuk Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

No	Tanggal	Materi yang Dikonsultasikan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Utama	No	Tanggal	Materi yang Dikonsultasikan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Anggota
1.	22 November 2021	Pengajuan Judul		1.	26 November 2021	Bimbingan BAB I Rumusan masalah Dan Tujuan masalah Penelitian	
2.	24 November 2021	Bimbingan BAB I Revisi Latar belakang		2.	14 Desember 2021	Konsultasi BAB II Revisi BAB I	



## UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

FAKULTAS ILMU KESEHATAN DAN FAKULTAS EKONOMI DAN BISNIS

Jl. Dr. Soebandi No. 99 Jember, Telp/Fax: (0331) 483536,

E-mail : [info@atkeadrasoebandi.ac.id](mailto:info@atkeadrasoebandi.ac.id) <http://www.atkeadrasoebandi.ac.id>

No	Tanggal	Materi yang Dikonsultasikan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Utama	No	Tanggal	Materi yang Dikonsultasikan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Anggota
3.	7 Desember 2021	Konsultasi BAB I Revisi BAB I		3.	16 Desember 2021	Revisi BAB I Konsultasi BAB II	
4.	18 Desember 2021	Revisi BAB I dan BAB II		4.	18 Desember 2021	Revisi BAB II Konsultasi BAB III	
5.	22 Desember 2021	Konsultasi BAB III Revisi BAB II		5.	22 Desember 2021	Revisi BAB II dan BAB III	



## UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

FAKULTAS ILMU KESEHATAN DAN FAKULTAS EKONOMI DAN BISNIS

Jl. Dr. Soebandi No. 99 Jember, Telp/Fax: (0331) 483536,

E-mail: [info@iikhsuobandi.ac.id](mailto:info@iikhsuobandi.ac.id) | <http://www.u1ikhsuobandi.ac.id>

No	Tanggal	Materi yang Dikonsultasikan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Utama	No	Tanggal	Materi yang Dikonsultasikan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Anggota
6.	14. Januari 2022	Konsultasi BAB IV Revisi BAB I, II, dan III		6.	25 Desember 2021	Konsultasi BAB IV	
7.	21 April 2022	Revisi BAB I, II, III, dan IV Penambahan Judul		7.	26 April 2022	Revisi BAB I, II, III, dan IV Penggajian perubahan Judul	
8.	23 April 2022	Revisi BAB I, II, III, dan IV		8.	29 April 2022	Revisi BAB I, II, III, dan IV	

## Lampiran 9. Lembar Konsultasi Skripsi



## UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

FAKULTAS ILMU KESEHATAN DAN FAKULTAS EKONOMI DAN BISNIS  
 Jl. Dr Soebandi No. 99 Jember, Telp/Fax. (0331) 483536,  
 E\_mail : [info@stikesdrsoebandi.ac.id](mailto:info@stikesdrsoebandi.ac.id) Website : <http://www.stikesdrsoebandi.ac.id>

### LEMBAR KONSULTASI PEMBIMBINGAN SKRIPSI PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

Nama Mahasiswa : Rikza Ilmiana  
 NIM : 18040089  
 Judul : Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis Pada Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

No	Tanggal	Materi yang Dikonsultasikan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Utama	No	Tanggal	Materi yang Dikonsultasikan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Anggota
1	22 Agustus 2022	Konsultasi hasil Skoring Flavonoid		1	22 Agustus 2022	Konsultasi hasil Skoring Flavonoid	
2	24 Agustus 2022	Hasil optimasi panjang gelombang maksimum, operating time		2	02 September 2022	Hasil optimasi dan validasi metode	



**UNIVERSITAS dr. SOEBANDI**

FAKULTAS ILMU KESEHATAN DAN FAKULTAS EKONOMI DAN BISNIS

Jl. Dr Soebandi No. 99 Jember, Telp/Fax: (0331) 483536,

E-mail : [info@stikesdrsoebandi.ac.id](mailto:info@stikesdrsoebandi.ac.id) Website : <http://www.stikesdrsoebandi.ac.id>

No	Tanggal	Materi yang Dikonsulkan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Utama	No	Tanggal	Materi yang Dikonsulkan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Anggota
3	26 Agustus 2022	Hasil optimasi Kurva baku dan Konsentrasi optimum		3	13 September 2022	Hasil penutupan keadur.	
4	29 Agustus 2022	Hasil Validasi Analisis Spesifisitas, LOD & LOQ dan Linieritas		4	08 September 2022	Konsultasi BAB 5,6,7	
5	30 Agustus 2022	Hasil Validasi Analisis Akurasi dan presisi dan penutupan keadur		5	20 September 2022	Revisi BAB 5,6,7	



## UNIVERSITAS dr. SOEBANDI

FAKULTAS ILMU KESEHATAN DAN FAKULTAS EKONOMI DAN BISNIS

Jl. Dr. Soebandi No. 99 Jember, Telp/Fax. (0331) 483536,

E\_mail : [info@stikesdrsoebandi.ac.id](mailto:info@stikesdrsoebandi.ac.id) Website : <http://www.stikesdrsoebandi.ac.id>

No	Tanggal	Materi yang Dikonsultasikan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Utama	No	Tanggal	Materi yang Dikonsultasikan dan Masukan Pembimbing	TTD Pembimbing Anggota
6	12 September 2022	Hasil Olah Data Validasi Analisa Guru penerapan Labor		6	22 September 2022	Revisi pembahasam	
7	15 September 2022	Konsultasi BAB 5,6,7		7	24 September 2022	Revisi BAB 7	
8	22 September 2022	Konsultasi BAB 5,6,7 revisi BAB 5,6,7		8	26 September 2022	Revisi terakhir BAB 5,6,7	