

Bab VI Hasil dan Pembahasan

Metode KCKT merupakan suatu metode analisis yang dapat digunakan untuk pemisahan sehingga dalam proses pengerjaannya menjadi lebih cepat, tepat dan efisien. Pada penelitian ini pemisahan campuran senyawa didasarkan pada proses partisi yaitu fase diam dan fase gerak memiliki polaritas yang berbeda. Sistem yang digunakan yaitu sistem fase terbalik (*reversed phase*), dimana fase diam bersifat lebih non polar dibandingkan fase geraknya. Kolom yang digunakan yaitu kolom C18 yang memiliki gugus silika gel yang terikat pada oktadesil yang bersifat non polar dan fase gerak terdiri dari campuran metanol:aquadest yang bersifat polar.

VI.1 Pembuatan larutan baku Kafein

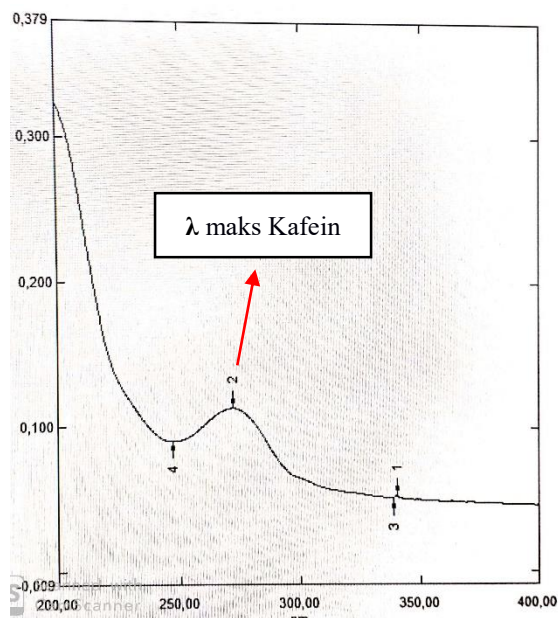
Larutan baku kafein dibuat dengan konsentrasi 500 bpj. Pembuatan larutan menggunakan pelarut metanol pro analisis karena kafein larut dengan baik dalam metanol. Dari larutan baku kafein 500 bpj, dibuat larutan intermediet 50 bpj. Dari larutan intermediet ini dibuat larutan seri baku kafein 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 bpj.

VI.2 Penentuan panjang gelombang serapan maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum ini bertujuan untuk mendapatkan panjang gelombang dengan serapan maksimum dari kafein. Analisis senyawa menggunakan KCKT memerlukan panjang gelombang dimana senyawa dapat memberikan absorbansi maksimum untuk dibaca pada detektor UV pada sistem KCKT sehingga diharapkan semua kadar kafein dalam sampel dapat terdeteksi oleh detektor UV.

Suatu senyawa dapat ditetapkan kadarnya secara spektrofotometri ultraviolet harus memiliki gugus kromofor dan auksokrom dimana kedua gugus ini bertanggung jawab dalam penyerapan radiasi ultraviolet pada sampel.

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan menggunakan larutan baku kafein yang diukur pada panjang gelombang 200-400 nm.



Gambar VI.1 Spektrum serapan maksimum kafein

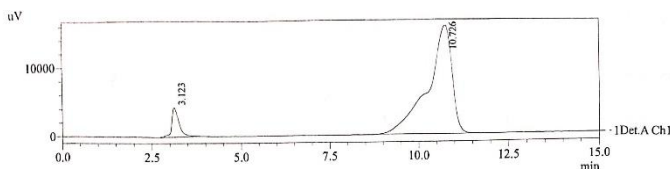
Berdasarkan gambar 4 terlihat bahwa serapan maksimum kafein dalam pelarut metanol adalah 272 nm. Secara teoritis, serapan maksimum kafein adalah 273 nm (Moffat dkk, 2011). Pergeseran

panjang gelombang yang terjadi pada kafein adalah 1 nm, sehingga panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada penelitian ini dapat diterima karena pengujian panjang gelombang maksimum dapat digunakan jika serapan maksimum tersebut tepat atau dalam batas 3nm dari panjang gelombang yang ditentukan (Snyder, 2010).

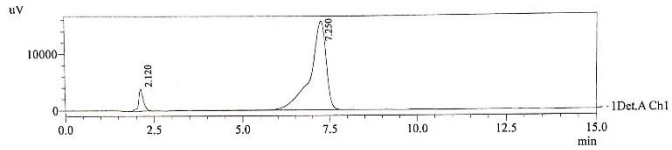
VI.3 Optimasi fase gerak dan laju alir

Optimasi fase gerak dilakukan agar diperoleh kondisi yang tepat dan efektif dari KCKT. Pengamatan waktu retensi kafein dilakukan pada fase gerak metanol:aquadest dengan perbandingan 30:70 dengan laju alir 0,5 ml/menit; 0,75 ml/menit; 1 ml/menit dan perbandingan metanol:aquadest 50:50 dengan laju alir 1 ml/menit.

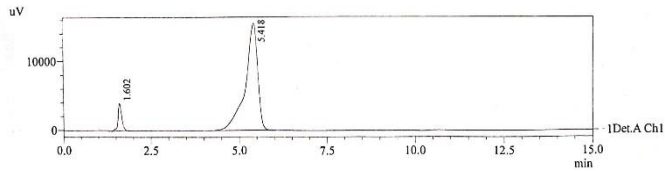
Hasil pengamatan waktu retensi dapat dilihat pada gambar berikut:



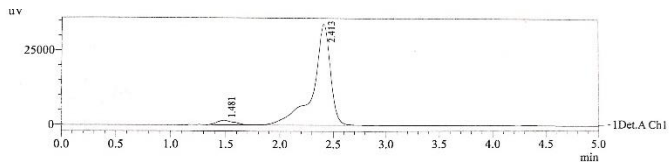
Gambar VI.2 Kromatogram Kafein dengan perbandingan fase gerak metanol:aquadest dengan perbandingan 30:70 dengan laju alir 0,5 ml/menit



Gambar VI.3 Kromatogram Kafein dengan perbandingan fase gerak metanol:aquades dengan perbandingan 30:70 dengan laju alir 0,75 ml/menit



Gambar VI.4 Kromatogram Kafein dengan perbandingan fase gerak metanol:aquades dengan perbandingan 30:70 dengan laju alir 1 ml/menit



Gambar VI.5 Kromatogram Kafein dengan perbandingan fase gerak metanol:aquades dengan perbandingan 50:50 dengan laju alir 1 ml/menit

Dari hasil kromatogram di atas dapat dirangkum pada tabel berikut:

Tabel VI.1 Optimasi fase gerak & laju alir

metanol:air/ laju alir	theoretical plates/meter	Tailing factor	K'	Ret. Time	Resolution
30:70 ; 0,5 ml/menit	14651,254	0,659	2,435	10,726	12,051
30:70 ; 0,75 ml/menit	12895,340	0,666	2,419	7,250	11,523
30:70 ; 1 ml/menit	10596,465	0,681	2,381	5,418	10,360
50:50 ; 1 ml/menit	10503,809	0,684	0,629	2,413	3,365

Dilihat dari tabel di atas menunjukkan bahwa pada perbandingan metanol:air 50:50 dengan laju alir 1 ml/menit memiliki waktu retensi yang lebih sedikit dibanding dengan perbandingan metanol:air dan laju alir yang lain.

VI.4 Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan sebelum suatu sistem digunakan untuk menentukan sistem analisis berjalan secara benar. Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menginjeksikan 6 kali. Uji kesesuaian sistem ini memiliki nilai parameter yaitu: lempeng teoritis (N), Tailing factor, kapasitas kolom (k'), waktu retensi dan resolusi. Hasil uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel VI.2 Uji Kesesuaian Sistem Kafein

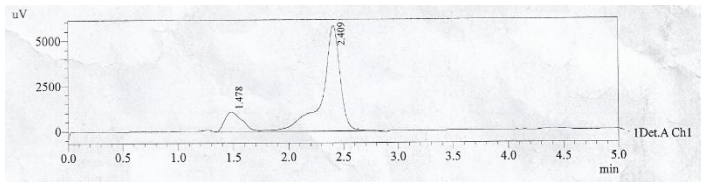
Pengulangan	RT	TF	K'	N Plates	Rs
1	2,405	0,684	1,135	11042,875	3,398
2	2,402	0,683	1,569	11206,434	3,402
3	2,398	0,681	1,118	11216,967	3,325
4	2,399	0,680	1,325	11283,826	3,399
5	2,405	0,678	1,140	11228,123	3,371
6	2,404	0,678	1,168	11294,967	3,418
Rata-rata	2,402	0,681	1,243	11212,199	3,385
SYARAT	≥ 1	$< 1,5$	$1 \leq k' \leq 10$	> 2000	> 2
Hasil	2,402	0,681	1,243	11212,199	3,385
Kesimpulan	MS	MS	MS	MS	MS

Dari hasil pengujian Uji kesesuaian sistem yang dapat dilihat pada tabel II menunjukkan bahwa semua parameter dari waktu retensi, tailing factor kapasitas kolom, lempeng teoritis dan resolusi sudah memenuhi syarat yang artinya setiap hasil analisis yang dilakukan memiliki nilai yang tidak berbeda jauh.

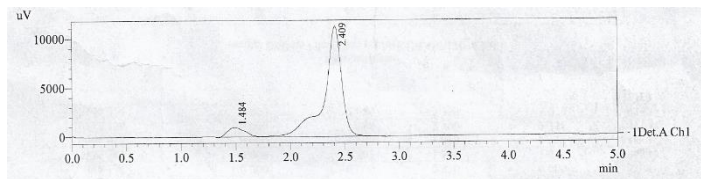
VI.5 Validasi metode analisis

1. Kurva kalibrasi

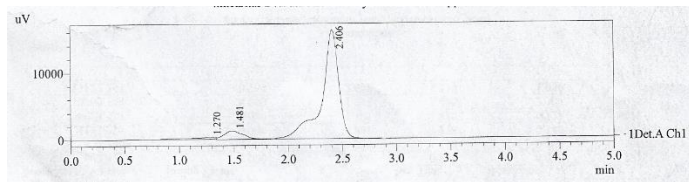
Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara konsentrasi seri baku kafein dengan respon instrumen berupa area under curve (AUC). Larutan seri baku kafein dibuat dengan enam konsentrasi yaitu 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 bpj. Dari hasil baku kafein ini dibuat kurva hubungan antara konsentrasi baku dengan respon AUC. Hasil pengukuran pada kurva kalibrasi dapat dilihat pada kromatogram dan tabel berikut ini:



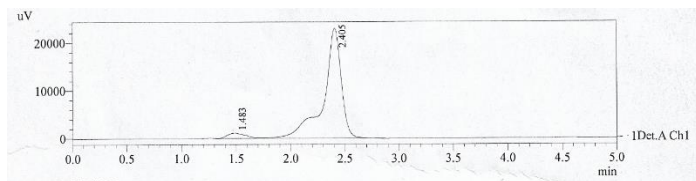
Gambar VI.6 Kromatogram baku kafein 1 bpj



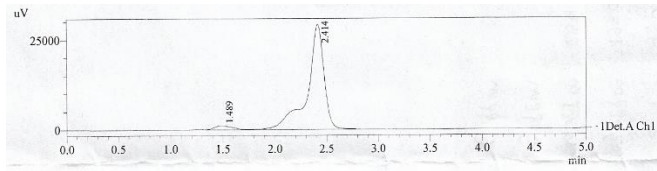
Gambar VI.7 Kromatogram baku kafein 2 bpj



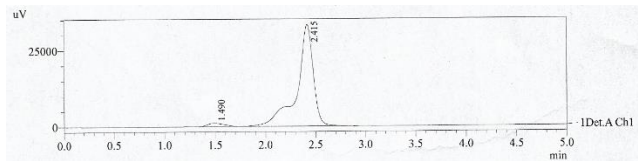
Gambar VI.8 Kromatogram baku kafein 3 bpj



Gambar VI.9 Kromatogram baku kafein 4 bpj



Gambar VI.10 Kromatogram baku kafein 5 bpj

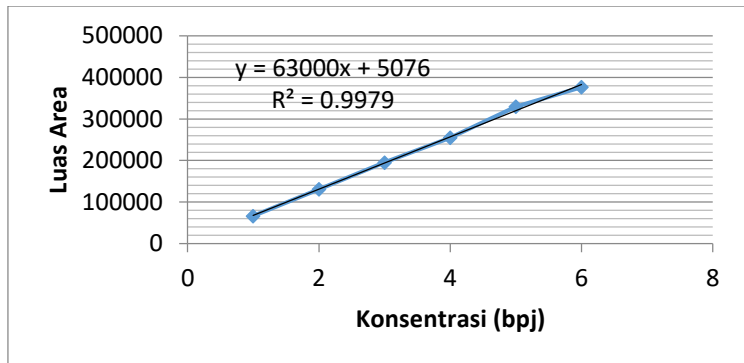


Gambar VI.11 Kromatogram baku kafein 6 bpj

Dari kromatogram di atas didapat data AUC dari masing-masing konsentrasi lalu dibuat persamaan regresi liniernya.

Tabel VI.3 Kurva kalibrasi kafein

Konsentrasi	AUC
1	66641
2	130831
3	195099
4	254851
5	329627
6	376416



Gambar VI.12 Kurva kalibrasi kafein

Pada hasil kurva kalibrasi kafein di atas menunjukkan persamaan $y = 63000x + 5076$ memiliki koefisien korelasi yang baik ($r = 0,9979$) sehingga persamaan kurva kalibrasi ini dapat digunakan untuk menghitung kadar kafein dalam sampel.

2. Batas deteksi dan batas kuantisasi

Batas deteksi dan batas kuantifikasi merupakan parameter sensitivitas dari suatu metode analisis. Nilai batas deteksi dan kuantisasi semakin rendah akan lebih baik karena nilai kecil ini menandakan semakin sensitif suatu metode dalam menganalisis dan mengukur kadar. Berikut adalah tabel data pengukuran batas deteksi dan kuantisasi kafein:

Tabel VI.4 Batas deteksi dan batas kuantisasi

Konsentrasi	Area	Yi	(Yi-Yi)2
1	66641	68076	2059225
2	130831	131076	60025
3	195099	194076	1046529
4	254851	257076	4950625
5	329627	320076	91221601
6	376416	383076	44355600
		Total	143693605
		$s(y/x)^2$	35923401
		$s(y/x)$	5993,613
		LOD	0,285
		LOQ	0,951

Perhitungan batas deteksi dan kuantisasi ini dilakukan dengan menggunakan regresi linear dari kurva kalibrasi. Hasil dari uji batas deteksi yaitu 0,285 bpj dan hasil dari batas kuantisasi sebesar 0,951 bpj.

3. Uji presisi dan akurasi

Akurasi merupakan kedekatan hasil yang diperoleh pada saat penelitian dibandingkan dengan hasil yang sebenarnya, dan presisi merupakan kedekatan antar hasil pengukuran pada kondisi yang telah ditentukan dan dinyatakan dengan nilai koefisien varisasi. Penetapan akurasi dilakukan menggunakan tiga seri konsentrasi metode adisi dengan tiga kali replikasi. Sedangkan presisi dilakukan menggunakan satu seri konsentrasi metode adisi dengan enam kali replikasi.

Berikut adalah tabel data pengukuran presisi:

Tabel VI.5 Hasil presisi

Pengulangan	Area	C (bpj)
1	375075	6,386
2	374388	6,368
3	377728	6,452
4	382094	6,561
5	377735	6,452
6	376839	6,430
	Rata-rata	6,441
	SD	0,068
	%RSD	1,055

Pada hasil pengukuran presisi pada metode adisi didapatkan nilai RSD sebesar 0.721%. Ini menandakan bahwa hasil presisi ini memenuhi persyaratan yaitu $<2\%$ (Harmita, 2004).

Berikut adalah tabel akurasi:

Tabel VI.6 Hasil Akurasi

Nama	Area	C	% Recovery	SD	RSD%
4 ppm - 1	278993	3,986	99,65	0,865	0,861
4 ppm - 2	281763	4,055	101,38		
4 ppm - 3	280345	4,020	100,49		
		4,020	100,50		
5 ppm - 1	314056	4,862	97,23	1,766	1,781
5 ppm - 2	318973	4,984	99,69		
5 ppm - 3	320916	5,033	100,66		
		4,960	99,19		
6 ppm - 1	361119	6,037	100,62	0,474	0,473
6 ppm - 2	359127	5,987	99,79		
6 ppm - 3	361082	6,036	100,60		
		6,020	100,34		

Pada hasil di atas diperoleh data hasil pengukuran akurasi pada larutan metode adisi dengan 3 konsentrasi yaitu 80%, 100% dan 120%. Dari data tabel diatas didapatkan nilai rata-rata tiap konsentrasinya yaitu untuk 80% sebesar 87,39%, 100% sebesar 99,34% dan 120% sebesar 112,81%. Hasil tersebut dinyatakan memenuhi syarat yang telah ditetapkan yaitu sebesar 80%-120% (Harmita, 2004). Dengan demikian metode analisis yang digunakan dapat menghasilkan data kadar kafein yang dekat dengan kadar sebenarnya.

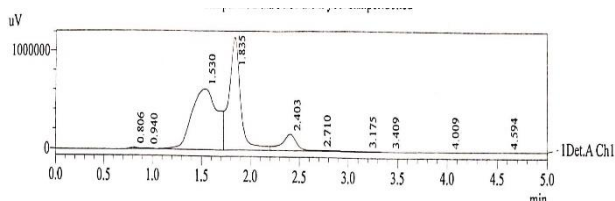
VI.6 Preparasi sampel

Sampel yang akan diinjeksikan pada sistem KCKT merupakan filtrat yang telah dipisahkan dari koloid dengan cara preparasi

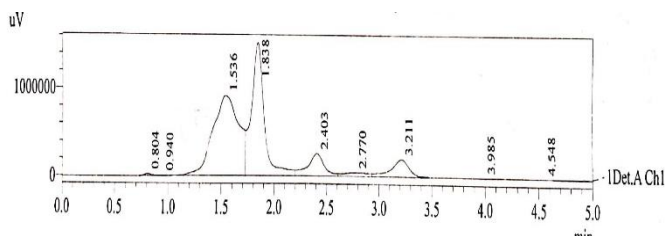
sampel kakao bubuk. Sampel dan baku kafein dilarutkan dengan metanol 10,0 ml yang dapat melarutkan kafein baku dan sampel. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali agar kafein dapat terlarut dengan baik. Filtrat yang sudah didapatkan disaring menggunakan penyaring membran 0,45 μm .

VI.7 Penetapan kadar

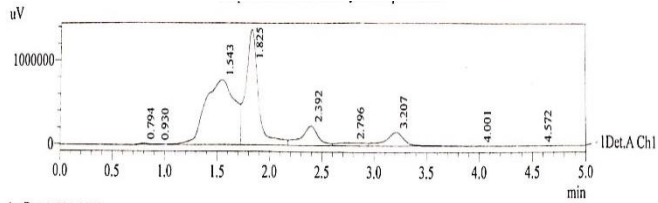
Penetapan kadar kafein dalam sampel kakao bubuk menggunakan fase gerak metanol: aquadest (50:50) dengan laju alir 1 ml/menit pada detektor 272 nm. Berikut adalah kromatogram pengukuran kadar kafein pada sampel:



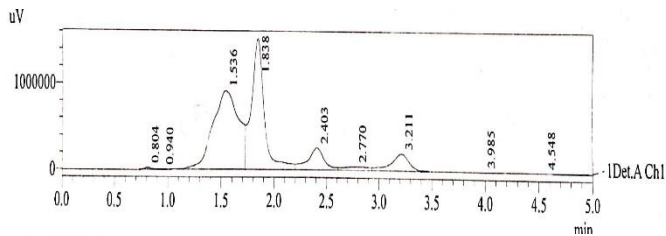
Gambar VI.13 Kromatogram sampel 1



Gambar VI.14 Kromatogram sampel 2



Gambar VI.15 Kromatogram sampel 3



Gambar VI.16 Kromatogram sampel 4

Berdasarkan data kromatogram tersebut diperoleh persen kadar kafein yang dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel VI.7 Data hasil pengukuran sampel

Sampel	C (bpj)	jumlah kafein (mg/g)
1	366,992	9,175
2	364,212	9,105
3	492,888	12,322
4	535,902	13,398

Dari data diatas, sampel 1 tersebut diperoleh nilai kadar kafein sebesar 9,175 mg/gram, sampel 2 sebesar 9,105 mg/gram, sampel 3 sebesar 12,322 mg/gram dan sampel 4 sebesar 13,398 mg/gram.

Dari peraturan BPOM tentang Ketentuan Pokok pengawasan suplemen makanan disebutkan bahwa dosis maksimum kafein adalah 150 mg/ hari yang dibagi minimal dalam tiga dosis. Berikut adalah rekomendasi sajian maksimum dari konsumsi kakao bubuk:

Tabel VI.8 Sajian maksimum konsumsi kakao bubuk

sampel	maks 1 sajian (gram)	maks 1 hari (gram)
1	5,450	16,349
2	5,491	16,474
3	4,058	12,173
4	3,732	11,196

Berdasarkan tabel di atas, maksimum konsumsi sampel 1 untuk satu sajian sebesar 5,450 gram atau konsumsi maksimal untuk satu hari sebesar 16,349 gram; sampel 2 untuk satu sajian sebesar 5,491 gram atau konsumsi maksimal untuk satu hari sebesar 16,474 gram; sampel 3 untuk satu sajian sebesar 4,058 gram atau konsumsi maksimal untuk satu hari sebesar 12,173 gram dan sampel 4 untuk satu sajian sebesar 3,732 gram atau konsumsi maksimal untuk satu hari sebesar 11,196 gram.

BAB VII Kesimpulan dan Saran