

BAB II Tinjauan Pustaka

II.1 Cokelat

Cokelat dihasilkan melalui serangkaian proses dari biji kakao. Biji kakao ini berasal dari tanaman kakao, *Theobroma cacao*, yang tumbuh hanya di daerah tropis. Istilah cokelat berasal dari *xocolatl* (bahasa suku Aztec) yang berarti minuman pahit (Alexander dkk, 2008).



Gambar II.1 *Theobroma cacao* (Wikipedia)

Secara garis besar, cokelat mengandung lemak 31%, karbohidrat 14%, dan protein 9%. Protein cokelat kaya akan asam amino triptofan, fenilalanin, dan tirosin. Kandungan lemak tinggi pada cokelat relatif tidak tengik karena cokelat mengandung 6% polifenol, yang berfungsi sebagai antioksidan pencegah tengik. Cokelat mengandung berbagai macam gula, pati, protein sayuran, kalium, magnesium, kalsium, natrium, zat besi, krom, berbagai macam vitamin (A, B1 tiamin, B2 riboflavin, D dan E), kafein dan feniletilamin (Mutiar, 2011).

II.2 Kafein

Kafein merupakan golongan alkaloid metilsantin yang ditemukan secara alami dalam daun, biji ataupun buah di lebih dari 63 jenis tanaman di seluruh dunia, namun paling banyak ditemukan dalam kopi, biji cokelat, kacang kola dan dalam daun teh. Dalam bentuk murninya, kafein merupakan serbuk putih dan berasa pahit. Rumus kimianya $C_8H_{10}N_4O_2$ dengan nama 1,3,5-trimetilsantin (Wanyika dkk, 2010).

Kelarutan kafein yaitu 1 gram larut dalam 50 mL air, 1 gram larut dalam 6 mL air pada suhu 80°C , 1 gram larut dalam 75 mL alkohol, 1 gram larut dalam ± 25 mL alkohol pada suhu 60°C , 1 gram larut dalam 6 mL kloroform, dan 1 gram larut dalam 600 mL eter (Gennaro, 2000), 50 mL aseton dan 100 mL benzen (Moffat dkk, 2004)



Gambar II.2 Struktur kafein (Wikipedia)

II.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu metoda pemisahan canggih dalam analisis farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas, uji kemurnian dan penetapan kadar. Titik beratnya adalah untuk analisis senyawa-senyawa yang tidak

mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi, yang tidak bisa dianalisis dengan Kromatografi Gas.

Keunggulan metoda KCKT dibanding metoda pemisahan lainnya terletak pada ketepatan analisis dan kepekaan yang tinggi serta cocok untuk memisahkan senyawa-senyawa non volatil yang tidak tahan pada pemanasan. Peningkatan kecepatan dan efisiensi pemisahannya terkait dengan peningkatan performa kolomnya yang menggunakan kolom dengan ukuran dimensi dan partikel yang jauh lebih kecil dari kolom yang dipakai pada kromatografi kolom konvensional, sehingga agar fase gerak dapat mengalir pada kolom, fase gerak dipompa dengan tekanan tinggi. Di samping itu, kinerja tingginya dalam analisis didukung dengan adanya berbagai sistem deteksi dengan kepekaan tinggi yang dapat diintegrasikan dengan sistem kromatografinya.

II.4 Tipe KCKT

KCKT memiliki beberapa jenis tipe sesuai dengan kebutuhan analisis. Berikut adalah macam-macam KCKT:

1. Kromatografi Partisi

Kromatografi partisi merupakan prinsip kromatografi yang paling luas pemanfaatannya dalam KCKT dibanding empat tipe lainnya. Pada awalnya, kromatografi partisi digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa non-ionik dan senyawa polar dengan bobot molekul sedang ($BM < 3000$). Sekarang, dengan semakin berkembangnya metoda derivatisasi dan pasangan ion maka prinsip kromatografi

partisi juga telah digunakan untuk pemisahan senyawa-senyawa ionik.

2. Kromatografi Adsorpsi

Kromatografi adsorpsi atau kromatografi cair-padat adalah bentuk klasik dari kromatografi cair yang pertama diperkenalkan oleh Tswett pada awal abad 20. Pada saat sekarang ini, kromatografi adsorpsi telah diadaptasi dan menjadi bagian yang penting dari metoda KCKT. Fase diam yang digunakan pada KCKT cair-padat adalah silika dan alumina, meskipun demikian sekitar 90% kromatografi ini memakai silika sebagai fase diamnya. Pada silika dan alumina terdapat gugus hidroksi yang akan berinteraksi dengan zat terlarut. Gugus silanol pada silika mempunyai reaktivitas yang berbeda, karenanya zat terlarut dapat terikat secara kuat sehingga dapat menyebabkan puncak yang berekor (*tailing*). Fase gerak yang digunakan untuk fase diam silika atau alumina berupa pelarut non polar yang ditambah dengan pelarut polar seperti air atau alkohol rantai pendek untuk meningkatkan kemampuan elusinya sehingga tidak timbul pengekoran puncak, misal n-heksana ditambah dengan metanol.

3. Kromatografi pertukaran ion

Kromatografi Pertukaran ion adalah suatu metoda pemurnian menggunakan fase diam yang dapat menukar kation atau anion dengan suatu fase gerak. Fase diam tersebut merupakan suatu matriks yang kuat (rigid), yang

permukaannya mempunyai muatan, dapat berupa muatan positif maupun negatif. Mekanisme pemisahan berdasarkan pada daya tarik elektrostatis. Metode ini banyak digunakan dalam memisahkan molekul protein (terutama enzim). Molekul lain yang umumnya dapat dimurnikan dengan menggunakan kromatografi pertukaran ion ini antara lain senyawa alkohol, alkaloid, asam amino, dan nikotin.

4. Kromatografi Eklusi

Kromatografi eklusi adalah suatu kromatografi kolom yang proses pemisahannya didasarkan atas ukuran partikel zat terlarut. Kromatografi eklusi dapat digunakan untuk memisahkan suatu senyawa dari senyawa lain yang mempunyai berat molekul lebih rendah atau tinggi, atau untuk memisahkan molekul-molekul yang mempunyai berat molekul sama tetapi diameter berbeda.

II.5 Komponen KCKT

Komponen KCKT terdiri dari *Reservoir* fase gerak dan *system treatment* pelarut, pompa, injektor, kolom dan detector.

1. *Reservoir* fase gerak dan *system treatment* pelarut

Peralatan KCKT modern dilengkapi dengan satu atau beberapa *reservoir* pelarut yang terbuat dari kaca atau *stainless steel* yang mampu memuat 200 sampai 1000 mL pelarut. *Reservoir* dilengkapi dengan suatu alat *degasser* yang dapat menghilangkan gas terlarut pada fase gerak

(biasanya oksigen dan nitrogen) yang mengganggu analisis karena dapat membentuk gelembung pada kolom dan sistem detector. *Degasser* terdiri dari suatu pompa vakum, sistem destilasi, alat pemanas dan suatu sistem pengaduk pelarut.

2. Pompa

Berbagai pompa tersedia untuk kromatografi cair. Semuanya dirancang untuk mendorong berbagai pelarut melalui kolom yang dikemas rapat. Karena tekanan kolom terhadap aliran tinggi maka pompa harus bekerja pada tekanan tinggi, sering kali lebih besar dari 1000 psi.

3. Injektor

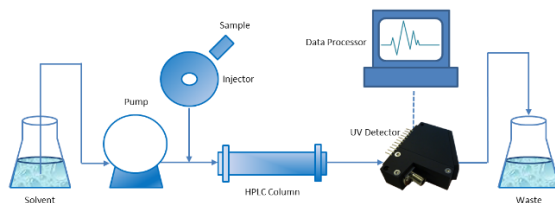
Injeksi sampel untuk dianalisis dengan metoda KCKT merupakan tahap yang penting, karena meskipun kolom telah memadai hasil kromatogram yang ditampilkan tidak akan memadai kalau injeksi sampel tidak dilakukan dengan tepat. Keadaan ini akan menjadi suatu keharusan jika yang dituju adalah analisis kuantitatif dengan KCKT.

4. Kolom

Kolom pada KCKT merupakan bagian yang sangat penting, sebab pemisahan komponen – komponen sampel akan terjadi di dalam kolom. Kolom KCKT dibuat dalam bentuk lurus yang dimaksudkan untuk efisiensi kolom, sehingga didapatkan harga H minimal.

5. Detektor

Suatu detektor dibutuhkan pada KCKT untuk mendeteksi adanya komponen analit (analisis kualitatif) yang berhasil elusi dari dalam kolom dan menentukan kadarnya (analisis kuantitatif).



Gambar II.3 Komponen KCKT (ibsen.com)

Analisis dengan KCKT bisa digunakan untuk analisis kualitatif dan analisis kuantitatif. Sebuah kromatogram akan memberikan informasi kualitatif terhadap zat terlarut tertentu dalam suatu sampel. Hal ini dapat dilihat dari waktu retensi (t_R) atau posisi pada fasa diam setelah masa elusi tertentu. Sejumlah informasi kromatogram dapat juga dibandingkan dengan spektrum IR tunggal, NMR atau Massa. Jika sampel tidak menghasilkan puncak pada waktu retensi (t_R) yang sama dengan standar, yang dijalankan dalam kondisi identik tertentu maka dapat diasumsikan senyawa ini tidak ada dalam sampel atau kadar dibawah limit deteksi dari prosedur. Analisa kuantitatif dari massa zat terlarut dalam suatu sampel dapat dilakukan berdasarkan perbandingan pengukuran tinggi atau luas puncak dari zat terlarut dengan puncak standar referensi pada konsentrasi yang diketahui.

II.6 Kemasan Fase Normal (*Normal Phases*) Dan Fase Terbalik (*Reverse Phases*)

Kromatografi partisi dapat dibedakan berdasarkan pada kepolaran relatif fase diam dan fase gerak. Pada masa awal, penggunaan kromatografi cair menggunakan fase diam yang sangat polar seperti air atau trietilenglikol yang terikat pada partikel silika atau alumina; fase gerak adalah pelarut yang relatif kurang polar seperti heksan atau iso propil eter. Tipe kromatografi ini dikenal sebagai kromatografi fase normal.

Pada kromatografi fase terbalik, fase diam adalah senyawa non polar (biasanya suatu hidrokarbon) dan fase gerak pelarut yang relatif lebih polar seperti air, metanol atau asetonitril. Pada kromatografi fase normal, senyawa yang kurang polar elusi lebih awal karena senyawa non polar paling baik kelarutannya dalam fase gerak. Peningkatan kepolaran fase gerak dapat memperpendek waktu elusi. Sebaliknya, pada kromatografi fase terbalik senyawa-senyawa polar akan terelusi lebih awal, dan peningkatan kepolaran fase gerak akan memperbesar waktu elusi.

II.7 Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem adalah serangkaian uji yang dilakukan untuk menjamin metode yang digunakan tersebut dapat memiliki akurasi dan presisi yang valid. *United State Pharmacopoeia* (USP) menentukan parameter yang digunakan dalam uji kesesuaian sistem sebelum dianalisis. Parameter tersebut yaitu: bilangan lempeng teori (N), faktor *tailing*, kapasitas (k' atau α) dan nilai

standar deviasi relative (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi. Kriteria persyaratan yang harus dipenuhi yaitu jika $RSD < 1\%$ untuk 5 kali injeksi larutan baku pada pengujian komponen yang jumlahnya banyak (mayor) dan untuk senyawa dengan kadar yang sedikit, nilai RSD dapat diterima jika berada diantara 5-15% (Gandjar dan Rohman, 2007).

Persyaratan UKS menurut United States Pharmacopeia untuk KCKT, yaitu:

1. k' (Kapasitas kolom): $1 \leq k' \leq 10$
2. N (Lempeng teoritis): > 2000
3. T_f (Tailing factor): $< 1,5$
4. R_s (Resolusi): ≥ 2
5. RT (Waktu retensi): ≥ 1

II.8 Validasi

1. Linearitas

Linearitas merupakan suatu metode bioanalisis yang diujikan untuk mengetahui adanya hubungan yang linier antara kadar senyawa dengan respon detektor. Linearitas didapat dari kurva kalibrasi yaitu dari koefisien korelasi (r). Rumus perhitungan linearitas:

$$S_{y/x} = \frac{\sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}}{n-2}$$

$$S_{x0} = \frac{S_{y/x}}{b}$$

$$Vx0 = \frac{Sx0}{x} \times 100\%$$

2. Batas deteksi

Batas deteksi merupakan konsentrasi atau kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko (y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko ($3S_b$) (Gandjar dan Rohman, 2007). Persyaratan batas deteksi adalah tiga kali noise. Rumus perhitungan batas deteksi ini dengan menggunakan perhitungan nilai noise dari alat KCKT:

$$BD = \frac{3 \times Sy/x}{b}$$

Keterangan: b = Slope

3. Batas kuantifikasi

Batas kuantifikasi merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi (Gandjar dan Rohman, 2007).

Rumus perhitungan batas kuantifikasi ini dengan menggunakan:

$$BK = \frac{10 \times Sy/x}{b}$$

Keterangan: b = slope

4. Akurasi

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai

konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan spiking pada suatu sampel (Gandjar, 2007). Harga perbandingan ini disebut persen perolehan kembali (*recovery*). Nilai keberterimaan adalah $RSD < 1\%$ dan nilai *recovery* antara 98-102 % (miller dan ermer, 2005).

Terdapat dua cara dalam menentukan kecermatan dalam suatu metode:

4.1 Metode Simulasi

Sejumlah analit ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi kemudian campuran tersebut di analisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang di tambahkan (kadar yang sebenarnya) (Harmita, 2004).

4. 2 Metode Adisi

Metode adisi dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan (Harmita, 2004).

5. Presisi

Presisi merupakan kedekatan hasil pengukuran satu analit dengan analit lainnya. Pengukuran presisi silakukan minimal

lima kali pengukuran untuk setiap konsentrasi dan minimal tiga konsentrasi yang berbeda. Pengukuran (RSD) tidak boleh lebih dari 15% (Harahap, 2010). Rumus perhitungan presisi yaitu:

$$\frac{Sy}{x} = \frac{\sqrt{(xi - x)^2}}{n - 1}$$

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

Keterangan: SD = standar deviasi/ simpangan baku

RSD = standar deviasi (Relatif standard deviation)/ simpangan baku relatif

X = nilai dari masing-masing pengukuran

$\bar{X}$ = rata-rata dari pengukuran

N = frekuensi penetapan

6. Perolehan kembali (% recovery)

Pengujian perolehan kembali (% recovery) merupakan pengujian respon detektor yang diperoleh dari sejumlah analit yang diperoleh dan sejumlah analit yang ditambahkan. Rumus perhitungan yaitu:

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{konsentrasi pengukuran}}{\text{konsentrasi teoritis}} \times 100 \%$$