

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Kopi

Jenis kopi yang paling banyak di produksi di Indonesia diantaranya adalah kopi Robusta. Kopi robusta diproduksi mencapai 87,1 dari total produksi kopi Indonesia. Kopi robusta merupakan varietas yang paling banyak digunakan, namun mendominasi pasar dunia karena asam organik yang terkandung pada kopi robusta relatif tinggi, rasa lebih pahit dari kopi arabika, dan kurang diminati oleh konsumen domestik dan konsumen internasional. Komponen kimia yang terkandung seperti kafein, asam klorogenat, karbohidrat, lemak, asam amino, asam organic, trigonelin, dan mineral, dapat memberikan efek positif dan efek negatif terhadap kesehatan pecinta kopi. Golongan asam yang terkandung pada kopi dapat berpengaruh terhadap kualitas dan memberikan aroma dan rasa yang unik. Asam organik yang terkandung dalam biji kopi adalah kopi Robusta adalah 0,5-3,5%. Pada kondisi keasaman kopi berlebih dalam tubuh dapat berdampak buruk bagi kesehatan. Pada seseorang dengan lambung yang sensitif terhadap asam dapat terjadi peningkatan produksi asam lambung saat mengkonsumsi kopi dengan kandungan asam yang tinggi (Kasim *et al.* 2020).

2.2. Klasifikasi dan Morfologi Kopi



Gambar 2. 1 *Coffea spp.*

Berdasarkan hasil identifikasi Menurut Rahardjo (2012) klasifikasi tanaman kopi robusta adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Sub Kingdom : Tracheobionta

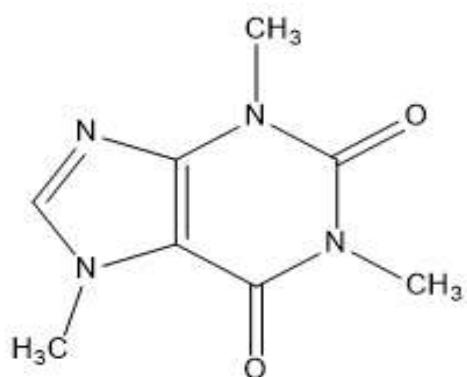
Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Asteridae
Ordo : Rubiales
Famili : Rubiaceae
Genus : Coffea,
Spesies : *Coffea canephora*

2.3. Senyawa Kafein



Gambar 2. 2 Struktur Kafein

Kopi adalah sumber kafein. Rumus kimia dari kafein adalah C₈H₁₀N₄O₂. Bentuk kafein murni yaitu kristal panjang, berwarna putih, tidak berbau yang cita rasanya pahit. Pada biji kopi kafein memiliki fungsi menjadi unsur aromadan rasa. Berat molekul kafein yaitu 194.19 gr, titik leleh 236°C & titik didih 178°C. Kafein merupakan senyawa alkaloid dan bersifat stimulan (merangsang). Kafein bisa dibentuk berdasarkan ekstrak kopi, teh dan cokelat. Pada dunia kesehatan kafein mempunyai manfaat yang sudah banyak digunakan. Kafein memiliki fungsi untuk merangsang kegiatan susunan saraf dan menaikan kerja jantung. Jika kafein dikonsumsi dalam jumlah tinggi akan bersifat racun dan mengganggu mekanisme susunan saraf manusia. (Z and Ratnawulan 2013).

2.4. KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Analisis menggunakan KLT merupakan pemisahan komponen berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi yang dipengaruhi oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Komponen kimia naik mengikuti fase gerak karena penyerapan adsorben terhadap komponen kimia tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak tidak sesuai dengan tingkat polaritasnya. Hal inilah yang menyebabkan terjadinya pemisahan komponen kimia dalam ekstrak. KLT dilakukan beberapa kali dengan menggunakan

berbagai eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda untuk mendapatkan pelarut yang dapat memberikan pemisahan yang baik dan pewarnaan zat warna yang baik. Analisis KLT pada ekstrak dilakukan dengan cara menotolkan kanya pada plat KLT yang dielusi menggunakan fase gerak (Hamdani and Nurman 2020).

Penggunaan KLT dapat dimulai dengan menempatkan sampel pada akhir fase diam kemudian dibiarkan kering. Ujung fase diam direndam dalam ruang yang berisi fase gerak. Campuran komponen sampel akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda ini disebut proses pengembangan kromatogram. Setelah fase gerak telah mencapai jarak yang ditentukan, fase diam diambil dan fase gerak di dalam pelat dikeringkan dan zona yang dihasilkan dideteksi menggunakan sinar ultraviolet. Deteksi suatu senyawa akan lebih mudah bila senyawa tersebut dapat diwarnai atau berfluoresensi. Metode TLC didasarkan pada perbandingan nilai R_f dibandingkan dengan nilai R_f standar (Wulandari, 2011). Hasil pengembangan menggambarkan dengan nilai faktor retensi (R_f). R_f merupakan nilai yang menyatakan perbandingan antara jarak perpindahan senyawa terhadap jarak tempuh fase gerak didalam plat dengan kisaran nilai adalah 0,2 – 0,8 dapat dihitung menggunakan persamaan.

$$R_f = \frac{x}{x_0}$$

Dimana X merupakan jarak yang ditempuh komponen, dan nilai X_0 merupakan jarak yang ditempuh fase gerak.

2.4.1. Fase Diam

Pengoperasian kromatografi lapis tipis dapat menggunakan lapisan tipis silika atau alumina yang sesuai pada sebuah lapisan kaca atau logam. Silika gel merupakan fase diam yang umum digunakan, silika gel disebut juga sebagai asam silikat dan kieselgel yang merupakan bahan berpori amorf putih yang mengandung substansi yang dapat berfluoresensi pada sinar ultraviolet. Pemisahan terjadi terutama dengan ikatan hidrogen atau interaksi dipol dengan gugus silanol permukaan dengan menggunakan fase gerak lifofilik dan analit dipisahkan menjadi kelompok-kelompok sesuai dengan polaritasnya. Beberapa parameter yang harus diperhatikan dalam pemilihan fase diam yang baik yaitu ukuran partikel, luas permukaan, volume pori-pori dan distribusi diameter (Sherma and Fried, 2003).

2.4.2. Fase Gerak

Fase gerak adalah komponen yang sangat penting dalam suatu pemisahan, fase gerak akan berinteraksi dengan analit kemudian analit dan komponen lain yang berada dalam sampel terelusi (meninggalkan kolom menuju detektor). Eluent merupakan fase gerak yang berperan dalam proses elusi untuk larutan umpan untuk melewati fase diam (adsorbent). Interaksi antara fase diam dengan fase gerak sangat menunjukkan terjadinya pemisahan komponen (Fharida, 2008). Persyaratan untuk memilih dan mengoptimalkan fase gerak: 02.66.00/FRM-03/AKD-SPMI 7 - Fase gerak memiliki kemurnian yang sangat tinggi. - Daya elusi fase gerak diatur sedemikian rupa sehingga menghasilkan R_f berkisar antara 0,2 hingga 0,8 - Untuk memisahkan penggunaan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak dapat menentukan laju transfer dan akan menentukan nilai R_f .

2.5. KLT – Densitometri

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-densitometri adalah salah satu metode pemisahan yang lebih simple bisa mendapatkan pemisahan yang akurat untuk senyawa-senyawa yang tidak volatil dengan konsentrasi sangat kecil (dalam satuan mikro/semimikro) (Mufliah *et al.* 2015). Analisis ataupun control kualitas dilaboratorium banyak menggunakan Kromatografi lapis tipis. Hal ini karena mudah diperaktekan, reagen yang dipakai sensitive dan selektif. Untuk penetapan kadar bisa memakai kombinasi KLT dan Densitometri (KLT Densitometri). Dibandingkan dengan KCKT, KLT fase gerak yang digunakan tidak ada batas, sampel suspense atau keruh dapat ditetapkan kadarnya secara langsung, cepat, ekonomis, dan memungkinkan terjadi secara simultan (Savitri *et al.* 2019).

2.6. KLT video densitometri

KLT video densitometri adalah metode analisis kualitatif dan kuantitatif berdasarkan analisis gambar (Fauzan dkk. 2016). Metode KLT video densitometri digunakan karena lebih sederhana, lebih murah, dan dapat dikembangkan secara mandiri untuk tujuan komersial serta dapat digunakan sebagai instrumen analisis alternatif untuk menggantikan KLT pemindaian densitometri.(Emawati dkk. 2018).

Perkembangan terkini untuk kuantifikasi densitometrik kromatogram menggunakan analisis citra. Metode densitometri video TLC secara teknis didasarkan pada analisis citra, istilah ini mengacu pada penggunaan kamera digital untuk memperoleh citra

kromatogram di piring, kemudian mengunggah citra yang dihasilkan ke komputer, dan evaluasi kualitatif dan kuantitatif menggunakan berbagai program perangkat lunak yang tersedia. . tanpa perlu membeli instrumen komersial. . Ada beberapa opsi perangkat lunak untuk analisis gambar, termasuk TLC Analyzer, ImageJ, Just-TLC, dan Sorbfilm TLC. Perangkat lunak yang digunakan adalah Image J. ImageJ adalah program yang dikembangkan oleh National Institutes of Health (NIH) Ministry of Health and Human Services. di Amerika Serikat yang telah terbukti paling sederhana, termudah, dan paling serbaguna meskipun jenis perangkat lunak lain juga dapat digunakan. Perangkat lunak ImageJ menggunakan format gambar yang dapat berupa JPEG atau TIFF. Gambar dapat dioptimalkan dengan memilih warna domain terbaik. Misalnya, gambar dari pelat TLC yang melibatkan pendinginan fluoresensi dengan analit atau deteksi berbasis reaksi warna-demi-warna biasanya memerlukan pemilihan domain warna yang tepat dan gambar terbalik diperlukan agar piksel analit memiliki nilai positif sehubungan dengan latar belakang. piksel. , yang idealnya memiliki nilai yang kecil. . ImageJ dapat secara otomatis mengkompensasi perbedaan area apa pun (Sharma and Pandey 2010).

2.6.1. Scanning Densitometri

Jenis pemindaian optik:

- a. Satu.panjang.gelombang,.satu berkas.cahaya
- b. Satu.panjang.gelombang,.berkas.cahaya ganda
- c. Dua.panjang.gelombang, beras.cahaya tunggal

Sumber cahaya:

- a. Lampu.deuterium.(190-400 nm)
- b. Lampu.halogen tungsten.(350-800 nm)
- c. Lampu.xenon.atau uap merkuri tekanan tinggi.(254-578 nm)

2.6.2. Video Densitometri

Video densitometry menggunakan sistem pencitraan yang terdiri dari.

- a. Kamera CCD resolusi tinggi dengan zoom untuk fokus dan memperbesar Kromatogram , jika diperlukan dan sistem perekaman yang sesua.
- b. Kamera ini dihubungkan ke komputer (basanya PC) dan printer Video
- c. Perangkat lunak untuk mengatur kamera dan semua parameter seperti kecerahan, kontras , keseimbangan warna dan intesitas.
- d. Kromatogram dapat disajikan dalam gambar pada printer video dan dapat diukur untuk mengetahui konsentrasi analit seperti pada pemindaian densitometry.

- e. Untuk analit yang lema berfluoresen, digunakan aperture kamera yang kecil (f:22) dapat digunakan dengan integrasi lama.

2.6.3. Prinsip KLT Video Densitometri

KLT Video densitometri didasarkan pada prinsip pemindaian optik elektronik menggunakan komputer yang dilengkapi dengan video digital, monokromator, sumber cahaya dan menggunakan optik untuk menerangi pelat dan fokus pada gambar ke dalam perangkat charge-coupled (CCD). Daya tarik utama densitometri video untuk pendekslsian di TLC terletak pada pengambilan data yang cepat dan simultan, bentuk instrumen yang sederhana, tidak ada bagian yang bergerak, sensitivitas dan analisis data yang lebih tinggi. Densitometri video tidak dapat digunakan untuk pemindaian densitometri dalam hal sensitivitas, resolusi. Dan penggunaan berbagai pengukuran panjang gelombang (Fitriawati, 2016)

2.6.4. Kelebihan KLT Video Densitometri

Video densitometri mampu memvisualisasikan bentuk suatu kromatogram dan dapat digunakan untuk berbagai sampel dengan biaya perawatan dan operasional yang rendah (Fried, 1999) Dibandingkan dengan metode HPLC, metode kromatografi lapis tipis memiliki keunggulan seperti lebih murah dan lebih mudah digunakan. , alat yang digunakan sederhana. . Metode videodensitometri TLC dapat dikembangkan secara bebas untuk kebutuhan komersial dan dapat digunakan sebagai pilihan untuk TLC densitometri (Emawati et al., 2018).

2.7 Validasi Metode

Validasi metode merupakan serangkaian prosedur untuk memenuhi standar uji eksperimental dengan beberapa penilaian parameter berdasarkan eksperimen untuk mengkonfirmasi dan memastikan metode analitis memenuhi persyaratan penggunaannya (Harmita 2004). Beberapa parameter dari validasi metode yaitu :

2.7.1 Uji Selektivitas

Selektivitas adalah pengukuran yang tepat dari zat tertentu dengan adanya komponen lain dan mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas sering dapat dinyatakan sebagai derajat bias metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan tambahan berupa produk penguraian, senyawa sejenis, senyawa asing, kontaminan lain, dan hasil analisis dibandingkan dengan sampel yang tidak mengandung. bahan lain ditambahkan. . Metode selektivitas dapat ditentukan dengan membandingkan hasil sampel yang diasumsikan yang memiliki kontaminasi, produk penguraian, senyawa

sejenis, senyawa asing lainnya dengan hasil sampel yang diasumsikan tanpa menggunakan penambahan bahan sebelumnya. Hasil simpangan jika masih terdapat perbedaan dari hasil kedua pengujian tersebut. Dan jika kontaminan dan produk dekomposisi tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diproduksi, maka selektivitas dapat ditunjukkan dengan menganalisis sampel yang mengandung kontaminan atau hasil uji dekomposisi dengan metode tersebut dan akan diuji kemudian dibandingkan menggunakan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, asumsi kelarutan fase-i, id Kalorimetri Pemindaian Diferensial. Tingkat kesepakatan antara dua asumsi adalah ukuran selektivitas. Dalam metode asumsi yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan dengan menghitung energi resolusi (Rs) (Harmita 2004).

2.7.2 Linieritas

Linearitas menggambarkan kemampuan berdasarkan metode analisis yang membandingkan respon secara langsung atau setiap perubahan yang terjadi pada satu variabel akan diikuti dengan menggunakan perubahan dengan menggunakan jumlah yang sama dan paralel pada variabel lainnya. Linearitas dihitung secara matematis berdasarkan data analitik pada sampel yang diperoleh dan dinyatakan pada garis regresi. Perhitungan linearitas dilakukan secara matematis melalui persamaan garis lurus antara keluaran analisis dan konsentrasi analit. Sampel yang dianalisis minimal 21 blanko yang terdiri dari delapan blanko. Parameter dalam linieritas yang digunakan adalah “koefisien korelasi” atau “r dalam regresi linier $Y = a + bX$ ”. Ikatan linier yang baik adalah jika $r = +1$ atau -1 dan $b = 0$ nilainya bergantung pada arah garis, sedangkan nilai a mewakili kerentanan berdasarkan analisis “instrumen yang digunakan” (Harmita 2004).

2.7.3 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi adalah untuk menggambarkan jumlah konsentrasi analit terendah ketika sampel yang dapat diterima terdeteksi dan masih memiliki respons yang signifikan dibandingkan dengan menggunakan blanko. Batas kuantitas menggambarkan kuantitas terendah berdasarkan analit dalam sampel yang mampu memenuhi kriteria. Batas deteksi dan batas kuantisasi dapat dipengaruhi berdasarkan garis regresi linier berdasarkan kurva kalibrasi yang telah dibentuk sebelumnya (Harmita 2004).

Cara menentukan limit deteksi dapat dengan cara non-instrumental, ditentukan dengan mengetahui analit dalam sampel dengan pengenceran bertahap dan metode instrument

dihitung dengan mengukur respon blangko beberapa kali kemudian menghitung simpangan baku blangko (Arfah dkk.,2020).

$$Q = \frac{kxSb}{sl}$$

Q: LOQ atau LOD

K : 3(LOD) dan 10 (LOQ)

Sb: Simpangan baku respon analitik blanko

SI : arah garis linier dari kurva antara respon terhadap konsentrasi + slope (b) pada persamaan garis $Y = a + bx$

2.7.4 Keseksamaan (Presisi)

Akurasi atau presisi adalah ukuran kesesuaian antara hasil tes individu, yang diukur dengan distribusi nilai rata-rata berulang dalam sampel. Akurasi dapat diukur dengan koefisien variasi standar. Presisi dapat dikatakan sebagai repeatability atau pengulangan. Metode yang dilakukan analis secara berulang dalam selang waktu yang pendek dalam kondisi yang sama disebut reproduktifitas, sedangkan reproduktifitas adalah metode yang dilakukan dalam kondisi yang berbeda, akurasinya dapat diterima jika standar deviasi relatif atau koefisien varians yang diberikan adalah 2% atau kurang, akurasi memenuhi persyaratan. Namun, kriteria ini dapat fleksibel karena tergantung pada beberapa komponen seperti situasi laboratorium, ukuran sampel dan konsentrasi analit, yang digunakan (Harmita 2004).

Presisi dapat dihitung dengan cara:

a) “Simpangan baku (standar Deviasi)”

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

b) “Simpangan baku Relatif (Koefisien Variasi)”

$$KV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

2.7.5 Kecermatan (Akurasi)

“Akurasi atau kecermatan” merupakan ukuran korelasi hasil dari analisis yang dilakukan dengan analit yang sebenarnya. Akurasi bisa diartikan dalam “persen perolehan kembali (*Recovery*)” dari analit yang dimasukan dan bisa dihitung menggunakan rumus:

$$Recovery = \frac{Kadar Terukur}{Kadar Sebenarnya} \times 100\%$$

faktor yang dapat mempengaruhi kecermatan merupakan salah satunya sebaran galat sistematis seluruh tahap dalam analisis. Maka dari itu galat harus dihindari dengan cara menggunakan alat yang sudah dikalibrasi terlebih dahulu, memakai perekusi dan juga pelarut yang cocok, dan lainnya (Harmita 2004).

Parameter akurasi dapat ditentukan dengan dua cara, yaitu dengan menggunakan metode adisi standar dan menggunakan metode simulasi (spiked-placebo recovery). Pada metode simulasi, bahan murni analit ditambahkan ke dalam campuran pembawa, kemudian hasilnya dibandingkan dan dianalisis dengan menambahkan kandungan analit, sedangkan pada metode penambahan standar, sampel dianalisis terlebih dahulu, kemudian sampel yang dianalisis ditambahkan angka analit dan dicampur dan kemudian dianalisis kembali (Harmita 2004).