



**VALIDASI METODE DAN PENETAPAN KADAR ASAM KLOOROGENAT
PADA EKSTRAK DAUN KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)
DENGAN METODE KLT DENSITOMETRI**

SKRIPSI

Oleh

**Ni Putu Pertiwi
NIM 112210101029**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**VALIDASI METODE DAN PENETAPAN KADAR ASAM KLOOROGENAT
PADA EKSTRAK DAUN KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)
DENGAN METODE KLT DENSITOMETRI**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Sarjana Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

**Ni Putu Pertiwi
NIM 112210101029**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ibu Ni Made Bakti dan Bapak I Ketut Sika, S.Pd., untuk doa, jerih payah, kasih sayang, semangat, motivasi dan kepercayaan yang selalu mengiringi perjalanan hidup penulis;
2. Adik Ni Made Dwi Ayu Jayanti, adik I Komang Adi Tri Utama dan Putu Tirta yang selalu menjadi penyemangat penulis;
3. Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang senantiasa sabar membimbing penulis;
4. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. dan Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Penguji yang dengan sabar memberikan masukan untuk penulis;
5. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

Berbuatlah hanya demi kewajibanmu, bukan hasil perbuatan itu (yang kau pikirkan),
jangan sekali kali pahala jadi motifmu dalam bekerja, jangan pula
hanya berdiam diri tanpa kerja.
(terjemahan Bhagawad Gita Bab II Sloka 47)*)

Berdoa, Berusaha dan Bersyukur
(penulis)

*) Ma, G.P.1999. *Bhagawad Gita (Pancama Veda)*. Paramita : Surabaya

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

nama : Ni Putu Pertiwi

NIM : 112210101029

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Validasi Metode dan Penetapan Kadar Asam Klorogenat pada Ekstrak Daun Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) dengan Metode KLT Densitometri” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 Maret 2015

Yang menyatakan

(Ni Putu Pertiwi)

NIM 112210101029

SKRIPSI

VALIDASI METODE DAN PENETAPAN KADAR ASAM KLOOROGENAT PADA EKSTRAK DAUN KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) DENGAN METODE KLT DENSITOMETRI

Oleh

Ni Putu Pertiwi
NIM 112210101029

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm.

Dosen Pembimbing Anggota : Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Validasi Metode dan Penetapan Kadar Asam Klorogenat pada Ekstrak Daun Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) dengan Metode KLT Densitometri” telah diuji dan disahkan pada :

Hari, tanggal : Jumat, 27 Maret 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

(Nia Kristiningrum., S.Farm., Apt., M.Farm.)

NIP 198204062006042001

Dosen Pembimbing Anggota,

(Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt.)

NIP 197806092005012004

Tim Penguji

Penguji I,

(Lesty Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.)

NIP 197604142002122001

Penguji II,

(Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D.)

NIP 196902011994031002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



(Lesty Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.)

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Validasi Metode dan Penetapan Kadar Asam Klorogenat pada Ekstrak Daun Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) dengan Metode KLT Densitometri; Ni Putu Pertiwi, 112210101029; 2015: 61 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kopi merupakan salah satu dari delapan komoditas utama perkebunan di Indonesia yang memiliki luas areal yang cukup besar serta menjadi komoditas ekspor yang sangat menjanjikan. Pemeliharaan kopi dilakukan dengan pemangkasan untuk tujuan agar pohon tetap rendah sehingga mudah perawatannya, membentuk cabang-cabang produksi yang baru, mempermudah masuknya cahaya, mempermudah pengendalian hama dan penyakit, agar unsur hara yang diberikan dapat tersalur kepada batang-batang yang lebih produktif dan supaya banyak menghasilkan buah. Dari proses pemangkasan ini dihasilkan banyak daun kopi yang berpotensi untuk dimanfaatkan. Pada penelitian sebelumnya, ditemukan bahwa pada daun kopi terdapat kandungan senyawa fenol dan kemungkinan salah satu senyawa fenol yang terkandung dalam daun kopi tersebut adalah asam klorogenat. Asam klorogenat mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antimutagenik, antitumor, antivirus, antikanker, analgesik, antipiretik, antiradang dan antijamur. Penelitian tentang penetapan kadar asam klorogenat menjadi penting untuk dilakukan guna mengetahui seberapa besar asam klorogenat yang terkandung dalam daun kopi. Pentingnya penelitian ini juga didukung oleh belum adanya publikasi mengenai penetapan kadar asam klorogenat pada daun kopi. Pada penelitian ini penetapan kadar asam klorogenat pada daun kopi menggunakan daun kopi robusta (*Coffea canephora*) karena perkebunan kopi di Indonesia dan khususnya di Jember, umumnya ditanami jenis kopi robusta dan metode yang digunakan adalah KLT Densitometri. Metode ini belum pernah dilakukan sebelumnya sehingga harus dilakukan validasi.

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah optimasi kondisi analisis, validasi metode analisis, serta penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi

robusta tua dan muda. Kondisi analisis yang dioptimasi meliputi optimasi eluen, penentuan panjang gelombang maksimum dan optimasi konsentrasi uji. Tahapan validasi metode analisis meliputi uji linieritas, uji kepekaan (batas deteksi dan batas kuantitasi), uji selektivitas dan spesifisitas, uji presisi dan uji akurasi. Tahap yang terakhir adalah penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta tua dan muda dengan metode KLT Densitometri yang sudah tervalidasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum metode untuk analisis asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta dengan metode KLT Densitometri yaitu menggunakan pelarut metanol p.a; fase diam silika Gel 60 F₂₅₄; fase gerak asam format : etil asetat : aquabidest (v/v/v) = 1:8:1,5 ; konsentrasi uji 50 ppm dan lempeng dianalisis dengan *scanner* Densitometri winCATS Camag menggunakan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 335 nm serta dengan metode pengembangan menaik. Metode analisis asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta dengan metode KLT Densitometri dapat memberikan hasil analisis yang linier dengan koefisien korelasi (r) = 0,998; nilai V_{xo} = 2,60% dan nilai X_p = 16,99 ng; peka dengan nilai batas deteksi = 16,22 ng dan batas kuantitasi= 48,66 ng; selektiv karena mampu memisahkan senyawa asam klorogenat dengan senyawa lain yang ada dalam sampel dengan nilai R_s lebih dari 1,5 dan spesifik dengan nilai korelasi spektra pada uji kemurnian dan uji identitas lebih dari 0,99; presisi dengan RSD uji presisi repeatibilitas = 0,99% dan RSD uji presisi antara = 1,75% dan akurat dengan *mean recovery* \pm RSD = 99,72% \pm 1,58%. Metode yang sudah tervalidasi, selanjutnya digunakan untuk penetapan kadar asam klorogenat pada daun kopi robusta tua dan muda. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan kadar rata-rata asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta tua \pm RSD sebesar 1,46%b/b \pm 0,74% dan kadar rata-rata asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta muda \pm RSD sebesar 1,04%b/b \pm 1,29%. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa metode KLT Densitometri yang sudah dikembangkan dapat digunakan untuk penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta dengan hasil yang valid.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Validasi Metode dan Penetapan Kadar Asam Klorogenat pada Ekstrak Daun Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) dengan Metode KLT Densitometri”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian serta dengan sabar membimbing penulis untuk menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;
3. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. dan Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Penguji yang dengan sabar memberikan saran dalam penulisan skripsi ini;
4. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, berbagi pengalaman dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan; staff dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Ibu Wayan dan Mbak Hani selaku teknisi Laboratorium Kimia Farmasi serta Ibu Widi dan Mbak Anggra selaku teknisi Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Jember yang telah membantu penulis selama penelitian;

7. Orang tua tercinta Ibu Ni Made Bakti dan Bapak I Ketut Sika, S.Pd. yang senantiasa memberi doa, kasih sayang, semangat dan motivasi yang tidak terhingga untuk mengiringi perjalanan hidup penulis; adik Ni Made Dwi Ayu Jayanti, I Komang Adi Tri Utama, Bapak I Nyoman Sutarya dan seluruh keluarga besar penulis yang selalu menjadi penyemangat penulis;
8. Putu Tirta yang selalu sabar memberi semangat, motivasi, hiburan dan telah menjadi kakak, sahabat serta teman terbaik untuk penulis;
9. Rekan kerja sekaligus sahabatku Yeni Nur Cahyani, terimakasih atas kerjasamanya saat penelitian dan kebersamaannya selama masa perkuliahan; teman-teman yang telah memberi warna hidupku selama di Jember (Estika, Prisma, Habibi, Puspita, Lintang Ayu, Alifia, Nur, Zuhro, Dewi Ni'ma, Vita Ariati, Bayu, Hilda, Mas Imam, Mas Alvan, Lia, Nanang);
10. Mbak Khoirun Nisa' S.Farm., atas segala inspirasi yang diberikan kepada penulis selama berada di Jember; Cici Liliyana Natsir yang selalu menjadi penyemangat penulis;
11. Teman-teman seperjuangan Angkatan 2011 Fakultas Farmasi Universitas Jember (*ASMEF*) yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu;
12. Anak-anak kos Mastrip I No.57B (Yeni, Zul, Catur, Berta, Elisa, Willi, Orin, Fitria, Mbak Frinda dan Mbak Ken) yang selalu bersama selama beberapa tahun terakhir ini dalam suka maupun duka;
13. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Tuhan Yang Maha Esa. Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 27 Maret 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR RUMUS	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Batasan Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Tentang Kopi Robusta	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Morfologi	5
2.1.3 Kandungan Kimia dan Manfaat	7
2.2 Tinjauan Tentang Asam Klorogenat	7

2.3 Tinjauan Metode Analisis untuk Penetapan	
Kadar Asam Klorogenat	9
2.4 Tinjauan Umum Tentang Kromatografi	
Lapis Tipis (KLT)	10
2.4.1 Pelaksanaan Analisis pada KLT	11
2.4.2 Sifat Fisika Kimia Analit	12
2.4.3 Analisis Kualitatif	12
2.4.4 Analisis Kuantitatif	13
2.4.5 Fase Diam	13
2.4.6 Fase Gerak	15
2.4.7 Aplikasi Sampel (Penotolan)	15
2.4.8 Elusi (Pengembangan)	16
2.4.9 Evaluasi Noda	18
2.4.10 Efisiensi Kromatografi	18
2.5 Tinjauan Tentang Densitometri	20
2.6 Optimasi Kondisi Analisis	22
2.7 Tinjauan Tentang Validasi Metode Analisis	23
2.7.1 Linieritas	23
2.7.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)	23
2.7.3 Selektivitas/Spesifisitas	24
2.7.4 Presisi	25
2.7.5 Akurasi	27
BAB 3. METODE PENELITIAN	29
3.1 Jenis Penelitian	29
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.3 Populasi dan Sampel	29
3.3.1 Populasi	29
3.3.2 Sampel	29

3.4 Rancangan Penelitian	30
3.4.1 Rancangan Percobaan	30
3.4.2 Alur Penelitian	31
3.5 Alat dan Bahan	32
3.5.1 Alat	32
3.5.2 Bahan	32
3.6 Pengumpulan Sampel	32
3.7 Pembuatan Ekstrak Daun Kopi Robusta	33
3.8 Optimasi Kondisi Analisis	35
3.8.1 Optimasi Eluen	35
3.8.2 Optimasi Panjang Gelombang	36
3.8.3 Optimasi Konsentrasi Uji	36
3.9 Validasi Metode Analisis	37
3.9.1 Linieritas	37
3.9.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)	38
3.9.3 Selektivitas/Spesifisitas	38
3.9.4 Presisi	39
3.9.5 Akurasi	39
3.10 Penetapan Kadar Asam Klorogenat dalam Ekstrak Daun Kopi Robusta Tua dan Muda	40
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	41
4.1 Optimasi Kondisi Analisis	41
4.1.1 Optimasi Eluen	41
4.1.2 Optimasi Panjang Gelombang	43
4.1.3 Optimasi Konsentrasi Uji	44
4.2 Validasi Metode Analisis	45
4.2.1 Linieritas	45
4.2.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)	46

4.2.3 Selektivitas/Spesifisitas	48
4.2.4 Presisi	52
4.2.5 Akurasi	53
4.3 Penetapan Kadar Asam Klorogenat pada Ekstrak Daun Kopi Robusta Tua dan Muda	55
BAB 5. PENUTUP	56
5.1 Kesimpulan	56
5.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Konsentrasi analit berbanding %RSD	26
2.2 Persen perolehan kembali (% <i>recovery</i>) analit pada konsentrasi yang berbeda	28
4.1 Perbandingan parameter efisiensi kromatogram pada komposisi eluen yang berbeda	42
4.2 Perbandingan nilai parameter efisiensi kromatogram pada konsentrasi analit yang berbeda	44
4.3 Kondisi optimum analisis asam klorogenat dengan KLT Densitometri	44
4.4 Hasil uji linieritas asam klorogenat	45
4.5 Hasil uji BD dan BK asam klorogenat	47
4.6 Hasil uji kemurnian asam klorogenat	51
4.7 Hasil uji identitas asam klorogenat	51
4.8 Hasil uji presisi repeatibilitas asam klorogenat	52
4.9 Hasil uji presisi antara asam klorogenat	53
4.10 Hasil uji akurasi asam klorogenat	54
4.11 Kadar asam klorogenat pada ekstrak daun kopi robusta tua	55
4.12 Kadar asam klorogenat pada ekstrak daun kopi robusta muda	55

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1a Daun kopi robusta muda.....	6
2.1b Daun kopi robusta tua.....	6
2.2 Struktur kimia asam klorogenat	8
2.3 Proses pengembangan lempeng KLT	17
2.4 Instrumen densitometri	20
2.5 Skema sistem optik densitometer	22
3.1 Diagram alur penelitian analisis kuantitatif asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta dengan metode KLT densitometri	31
4.1 Spektra standar asam klorogenat pada panjang gelombang 200-700 nm ...	43
4.2 Kurva linieritas massa vs area asam klorogenat	46
4.3 Kurva linieritas massa vs area asam klorogenat pada uji BD dan BK	47
4.4 Kromatogram pemisahan pada ekstrak daun kopi robusta tua	49
4.5a Spektra uji kemurnian asam klorogenat dalam standar dan sampel	50
4.5b Spektra uji identitas asam klorogenat dalam standar dan sampel.....	50

DAFTAR RUMUS

	Halaman
2.1 <i>Retardation Factor</i>	12
2.2 Resolusi	19
2.3 Nilai <i>Theoretical Plate</i> atau Lempeng Teori	19
2.4 Nilai <i>Height Equivalent of Theoretical Plate</i>	20
2.5 Batas Deteksi	24
2.6 Batas Kuantitasi	24
2.7 Persen Perolehan Kembali	27

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Data Optimasi Eluen	62
B. Data Optimasi Panjang Gelombang	66
C. Data Optimasi Konsentrasi Uji	66
D. Data Linieritas	67
E. Data Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	68
F. Data Selektivitas/Spesifisitas	70
G. Data Presisi	73
H. Data Akurasi	74
I. Data Penetapan Kadar Asam Klorogenat pada Ekstrak Daun Kopi Robusta Tua dan Muda	77

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi merupakan salah satu dari delapan komoditas utama perkebunan di Indonesia yang memiliki luas areal yang cukup besar serta menjadi komoditas ekspor yang sangat menjanjikan (Yashin *et al.*, 2013 ; Maridelana *et al.*, 2014). Pada pemeliharaan kopi, dilakukan pemangkasan dengan tujuan agar pohon tetap rendah sehingga mudah perawatannya, membentuk cabang-cabang produksi yang baru, mempermudah masuknya cahaya, mempermudah pengendalian hama dan penyakit, agar unsur hara yang diberikan dapat tersalur kepada batang-batang yang lebih produktif dan supaya banyak menghasilkan buah (Prastowo *et al.*, 2010). Dari pemangkasan yang dilakukan ini, maka daun kopi akan ikut dipangkas dan dibuang begitu saja.

Kopi adalah salah satu sumber antioksidan alami untuk tubuh manusia. Kandungan antioksidan yang tinggi pada kopi adalah asam klorogenat yang merupakan salah satu senyawa polifenol (Farah *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2008). Seperti pada biji kopi yang tidak disangrai (*green coffee bean*) terkandung asam klorogenat sebesar 6-12 % (Clifford, 1999). Pada penelitian yang dilakukan oleh Salgado *et al.* (2008) mengenai penetapan total fenol pada daun kopi tua serta daun kopi muda, ditemukan bahwa pada daun kopi tua mengandung total fenol sebesar 25% sedangkan pada daun kopi muda sebesar 46% dan kemungkinan salah satu senyawa fenol yang terkandung dalam daun kopi tersebut adalah asam klorogenat.

Asam klorogenat merupakan ester yang dibentuk dari asam *trans*-sinamat dan asam kuinat yang mempunyai gugus hidroksil pada posisi aksial pada karbon 1 dan 3 dan hidroksil equatorial pada karbon 4 dan 5 (Clifford, 1999). Asam klorogenat mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antimutagenik, antitumor dan antivirus

(Harborne *et al.*, 1999). Laporan terbaru menunjukkan bahwa senyawa ini terbukti menjadi antikanker. Laporan yang lebih baru lagi menunjukkan bahwa asam klorogenat juga memiliki aktivitas analgesik, antipiretik, antiradang dan antijamur (Lee *et al.*, 2008).

Penelitian tentang penetapan kadar asam klorogenat menjadi penting untuk dilakukan guna mengetahui seberapa besar potensi daun kopi sebagai antioksidan. Pentingnya penelitian ini juga didukung oleh belum adanya publikasi mengenai penetapan kadar asam klorogenat pada daun kopi. Beberapa sumber menunjukkan penelitian asam klorogenat sebagian besar dilakukan pada biji kopi dengan berbagai metode seperti metode Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (KLTKT) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Urakova *et al.*, 2008), Kromatografi Filtrasi Gel Kinerja Tinggi (Maria *et al.*, 1994) dan spektroskopi UV-VIS (Belay & Gholap, 2009).

Daun kopi yang akan ditetapkan kadar asam klorogenatnya adalah daun kopi robusta (*Coffea canephora*). Hal ini dikarenakan perkebunan kopi di Indonesia umumnya ditanami jenis kopi robusta. Dalam hal produksi, Indonesia menempati urutan ketiga dunia setelah Brazil dan Vietnam untuk kopi jenis robusta dengan jumlah produksi 5,82 juta karung pada tahun 2007 dan meningkat menjadi 6,01 juta karung pada tahun 2008 (Choiron, 2010). Begitu halnya di Kabupaten Jember, jenis kopi yang ditanam merupakan jenis robusta dan dikelola oleh Perusahaan Perkebunan Daerah dan Negara, Swasta dan Rakyat (Kristianta *et al.*, 2013).

Dalam penelitian ini metode yang digunakan adalah metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) karena metode ini mempunyai kelebihan yaitu spesifitas yang tinggi, dapat dipercaya, pengerjaan relatif mudah dan cepat, biaya pengoperasian relatif murah, polaritas pelarut atau campuran pelarut dapat diubah dalam waktu singkat dan jumlah pelarut yang digunakan lebih sedikit (Touchstone & Dobbins, dalam Martyanti, 2010). Suatu metode analisis yang baru harus divalidasi untuk membuktikan bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis tertentu serta validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa

metode analisis akurat, spesifik, reproduibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Rohman, 2009). Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Pada penelitian ini, parameter validasi yang diuji meliputi linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah dijabarkan, maka dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut.

- 1.2.1 Bagaimanakah kondisi optimum penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan metode KLT Densitometri ?
- 1.2.2 Apakah penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan metode KLT Densitometri dapat memberikan hasil analisis yang valid yaitu linier, peka, selektif/spesifik, presis dan akurat?
- 1.2.3 Berapakah kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) tua dan muda ?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjawab rumusan masalah yang ada, yaitu sebagai berikut.

- 1.3.1 Menentukan kondisi optimum penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan metode KLT Densitometri.
- 1.3.2 Menentukan validitas metode yang meliputi parameter kelinieritasan, kepekaan, kespesifikan dan keselektifan, keseksamaan serta keakuratan penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan metode KLT Densitometri.

- 1.3.3 Menentukan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) tua dan muda.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang didapatkan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut.

- 1.4.1 Menghasilkan suatu metode analisis untuk penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan metode KLT Densitometri.
- 1.4.2 Memberikan informasi awal mengenai kandungan asam klorogenat yang ada pada daun kopi robusta (*Coffea canephora*) sehingga nantinya dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan alami.

1.5 Batasan Penelitian

Adapun batasan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut.

- 1.5.1 Daun kopi robusta (*Coffea canephora*) yang digunakan berasal dari perkebunan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia yang berlokasi di Jalan Perkebunan Renteng PTPN XII Kecamatan Jenggawah, Kabupaten Jember.
- 1.5.2 Daun kopi robusta (*Coffea canephora*) yang digunakan adalah daun kopi robusta tua dan muda.
- 1.5.3 Daun tua adalah daun yang berwarna hijau tua dan teksturnya kasar yang tumbuh pada cabang *plagiotrop* yang terletak di bagian tengah pohon kopi robusta.
- 1.5.4 Daun muda adalah daun yang berwarna hijau terang dan teksturnya lembut yang tumbuh pada cabang *plagiotrop* yang terletak di bagian tengah pohon kopi robusta.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Kopi Robusta

2.1.1 Klasifikasi

Menurut *Integrated Taxonomic Information System* (2011), klasifikasi dari tanaman kopi robusta adalah sebagai berikut.

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophyta
Infradivisi	: Angiospermae
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Gentianales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: <i>Coffea</i>
Spesies	: <i>Coffea canephora</i> Peirre ex Froehner

2.1.2 Morfologi

Secara alami, tanaman kopi memiliki akar tunggang sehingga tidak mudah rebah. Namun, akar tunggang tersebut hanya dimiliki oleh tanaman kopi yang berasal dari bibit semai atau bibit sambung (okulasi) yang batang bawahnya berasal dari bibit semai. Sementara tanaman kopi yang berasal dari bibit setek, cangkok, atau okulasi yang batang bawahnya berasal dari bibit setek tidak memiliki akar tunggang sehingga relatif mudah rebah (AAK, 1988).

Kopi robusta mempunyai daun berbentuk bulat telur dengan ujung agak meruncing. Daun tumbuh berhadapan dengan batang, cabang dan ranting-rantingnya. Permukaan atas daun mengkilat, tepi rata, pangkal tumpul, panjang 5-15 cm; lebar

4,0-6,5 cm ; pertulangan menyirip, tangkai panjang 0,5-1,0 cm ; dan berwarna hijau (Najiyati dan Danarti, 2012). Pada umumnya daun kopi robusta lebih besar dari daun kopi arabika (Mutua, 2000). Gambar 2.1 menunjukkan daun kopi robusta muda dan tua.



(a) Daun kopi robusta muda ; (b) Daun kopi robusta tua

Gambar 2.1 Daun kopi robusta (Dokumentasi pribadi)

Batang dan cabang kopi berkayu, tegak lurus dan beruas-ruas. Tiap ruas hampir selalu ditumbuhi kuncup. Tanaman ini mempunyai dua macam pertumbuhan cabang, yaitu cabang *Orthotrop* dan *Plagiotrop*. Cabang *Orthotrop* merupakan cabang yang tumbuh tegak seperti batang, disebut juga tunas air atau wiwilan atau cabang air. Cabang ini tidak menghasilkan bunga atau buah. Cabang *Plagiotrop* merupakan cabang yang tumbuh ke samping. Cabang ini menghasilkan bunga dan buah (AAK, 1988).

Pada umumnya, tanaman kopi berbunga setelah berumur sekitar dua tahun. Bunga kopi berukuran kecil. Mahkota berwarna putih dan berbau harum. Kelopak bunga berwarna hijau. Bunga tersusun dalam kelompok, masing-masing terdiri dari 4-6 kuntum bunga. Tanaman kopi yang sudah cukup dewasa dan dipelihara dengan baik dapat menghasilkan ribuan bunga. Bila bunga sudah dewasa, kelopak dan

mahkota akan membuka, kemudian segera terjadi penyerbukan. Setelah itu bunga akan berkembang menjadi buah (AAK, 1988).

Buah kopi terdiri dari daging buah dan biji. Daging buah terdiri dari tiga bagian yaitu lapisan kulit luar (*eksokarp*), lapisan daging buah (*mesokarp*), dan lapisan kulit tanduk (*endokarp*) yang tipis, tetapi keras. Pada umumnya buah kopi mengandung dua butir biji, biji tersebut mempunyai dua bidang, bidang yang datar (perut) dan bidang yang cembung (punggung) (AAK, 1988).

2.1.3 Kandungan Kimia dan Manfaat

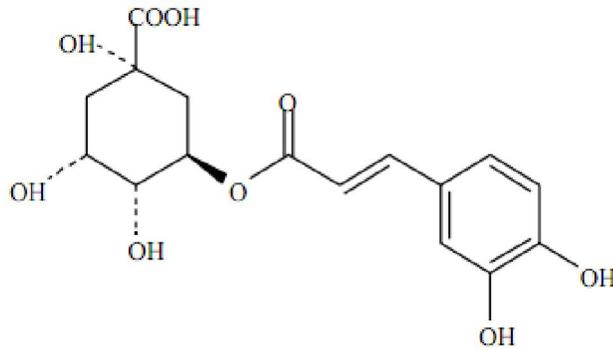
Kopi robusta memiliki banyak kandungan kimia pada bijinya seperti karbohidrat, senyawa nitrogen (protein, asam amino bebas, kafein, trigonelline), lemak (minyak kopi, diterpen), mineral, asam dan ester (asam klorogenat, asam kuintat). Senyawa-senyawa yang terkandung dalam biji kopi robusta ini memiliki manfaat tertentu seperti asam klorogenat, kafein, trigonelline, serat terlarut dan diterpen memiliki peran penting untuk menghasilkan aroma pada minuman kopi. Kafein memiliki efek menstimulasi sistem saraf pusat sebagai antagonis reseptor adenosine (Farah, 2012).

Dalam beberapa tahun terakhir, dilaporkan bahwa konsumsi kopi (masukan kafein) dapat memberi manfaat kesehatan berupa risiko yang lebih rendah terkena penyakit diabetes mellitus tipe 2, parkinson dan alzheimer. Studi *in vitro* dan pada hewan menunjukkan adanya antioksidan dan mekanisme lain yang melibatkan senyawa asam klorogenat (Farah, 2012).

2.2 Tinjauan Tentang Asam Klorogenat

Asam klorogenat merupakan ester yang dibentuk dari asam *trans*-sinamat (misalnya kafeat, ferulat dan *p*-kumarat) dan asam kuintat yang mempunyai gugus hidroksil pada posisi aksial pada karbon 1 dan 3 dan hidroksil equatorial pada karbon

4 dan 5 (Clifford, 1999 & Farah, 2012). Struktur asam klorogenat dapat dilihat pada Gambar 2.2 berikut ini.



Gambar 2.2 Struktur Kimia Asam Klorogenat (Tice, 1998)

Asam klorogenat memiliki sifat fisika kimia sebagai berikut.

Sinonim	: Asam 3-Caffeoylquinic, Asam 3-O-Caffeoylquinic
Rumus Molekul	: $C_{16}H_{18}O_9$
Berat Molekul	: 354,31
Titik lebur	: 208°C
Kelarutan	: Larut dalam air panas, alkohol, aseton dan sedikit larut dalam air suhu 25°C, etil asetat (Tice, 1998).

Asam klorogenat dikenal sebagai salah satu polifenol yang berlimpah dalam makanan manusia (Lee *et al.*, 2008). Biji kopi adalah salah satu sumber asam klorogenat terbesar pada makanan yang dikonsumsi manusia seperti pada biji kopi yang tidak disangrai (*green coffee bean*) mengandung asam klorogenat sebesar 6-12% (Clifford, 1999 ; Farah *et al.*, 2005). Dari sudut pandang gizi, asam klorogenat merupakan senyawa dengan aktivitas antioksidan yang kuat (Olthof, 2001). Pada penelitian yang dilakukan oleh Leonardis *et al.* (2008) mengenai potensi asam klorogenat dan metabolitnya sebagai antioksidan, ditemukan bahwa asam klorogenat

memiliki aktivitas antioksidan yang paling kuat dibandingkan dengan metabolitnya ketika ditambahkan pada minyak hati ikan cod.

Dalam beberapa tahun terakhir, sejumlah manfaat kesehatan yang berhubungan dengan konsumsi makanan dan minuman dengan kandungan asam klorogenat dalam jumlah tinggi telah dijelaskan dari penelitian epidemiologi. Dalam pengaturan dosis tertentu, asam klorogenat terbukti mengurangi risiko terhadap obesitas (Thom, 2007). Dalam beberapa penelitian yang dilakukan pada hewan, asam klorogenat juga menunjukkan aktivitas dalam metabolisme glukosa dan lipid seperti sebagai hipoglikemi, antidiabetes, peningkat sekresi insulin serta mengurangi kerentanan terhadap oksidasi LDL (Meng *et al.*, 2013). Asam klorogenat juga mempunyai aktivitas sebagai antihipertensi karena metabolit dari asam klorogenat mengurangi terjadinya stress oksidatif yang berefek pada penurunan tekanan darah melalui peningkatan fungsi endotel dan peningkatan bioavailabilitas nitrit oksida di pembuluh darah arteri (Zhao *et al.*, 2011). Laporan lain menunjukkan bahwa senyawa ini terbukti sebagai antikanker, analgesik, antipiretik, antiradang dan antijamur (Lee *et al.*, 2008). Selain itu, asam klorogenat mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antimutagenik, antitumor, antivirus (Harborne *et al.*, 1999).

2.3 Tinjauan Metode Analisis untuk Penetapan Kadar Asam klorogenat

Pada penelitian yang dilakukan oleh Urakova *et al.* (2008), pemisahan dan penetapan kadar asam klorogenat pada ekstrak biji kopi yang belum disangrai menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (KLTKT) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Pada penelitian ini menggunakan 6 sampel ekstrak kering biji kopi yang belum disangrai (berbeda satu sama lain) yang dijual di pasaran. Pada KLTKT digunakan fase diam berupa lempeng silika gel kiesel gel 60 F 254, fase gerak berupa etil asetat/diklorometana/asam format/asam asetat/air (100:25:10:10:11) dan panjang gelombang yang digunakan adalah 330 nm. Sedangkan pada KCKT menggunakan metode gradient *reverse phase* KCKT dengan

panjang gelombang 330 nm. Kandungan asam klorogenat pada 6 sampel yang digunakan yaitu $21,49 \pm 0,86\%$ dengan KLTKT dan $21,50 \pm 0,49\%$ dengan KCKT. Dari hasil ini menunjukkan tidak adanya perbedaan kadar asam klorogenat pada sampel yang diteliti dengan menggunakan metode KLTKT maupun KCKT.

Penelitian lain untuk penetapan kadar asam klorogenat juga dilakukan oleh Maria *et al.* (1994) dimana penetapan kadar asam klorogenat dilakukan secara simultan dengan penetapan kadar trigonellin dan kafein pada kopi yang belum disangrai dengan menggunakan metode Kromatografi Filtrasi Gel Kinerja Tinggi (KFGKT). Metode ini menunjukkan linieritas dan perolehan kembali yang baik dengan korelasi yang tinggi ketika dibandingkan dengan metode *reverse phase* KCKT. Dari metode ini diperoleh kadar asam klorogenat pada sampel sebesar $8,0 \pm 4,0\%$.

Penetapan kadar asam klorogenat pada biji kopi juga dilakukan oleh Belay & Gholap (2009) dimana sampel yang digunakan berasal dari barat daya Etiopia dengan menggunakan metode spektroskopi UV-Vis. Dari hasil penelitian ini didapatkan kadar asam klorogenat pada sampel yang diteliti berkisar antara $6,05 \pm 0,33\%$ - $6,25 \pm 0,23\%$.

2.4 Tinjauan Umum Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi merupakan metode analisis dimana fase gerak melewati sebuah fase stasioner sedemikian rupa sehingga campuran zat dipisahkan menjadi komponen. Istilah "kromatografi lapis tipis", diperkenalkan oleh E. Stahl pada tahun 1956, yang merupakan proses pemisahan kromatografi di mana fase stasioner terdiri dari lapisan tipis yang diletakkan pada substrat padat (Deinstrop, 2007). Menurut Wulandari (2011), KLT adalah metode pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan sifat fisika kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel menyebabkan perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen sehingga menyebabkan perbedaan kecepatan migrasi.

Kromatografi Lapis Tipis digunakan jika analit tidak mudah menguap atau volatilitasnya rendah ; analit sangat polar, polaritas mediumnya nonpolar atau ionik ; sampel dalam jumlah yang banyak yang harus dianalisis secara simultan, menghemat biaya dan waktu ; sampel yang dianalisis akan merusak kolom dari LC (*Liquid Chromatography*) atau GC (*Gas Chromatography*) ; setelah kromatografi, semua komponen dari sampel harus dapat dideteksi (tetap pada posisi awal atau bermigrasi ke depan); campuran komponen yang telah dipisahkan harus dideteksi secara individual (Deinstrop, 2007).

2.4.1 Pelaksanaan Analisis pada KLT

Pelaksanaan analisis pada KLT diawali dengan menotolkan alikuot kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT) untuk membentuk zona awal. Kemudian sampel dikeringkan. Ujung fase diam yang terdapat zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal ataupun campuran dua sampai empat pelarut murni) di dalam *chamber*. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, campuran komponen-komponen bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam. Hal ini disebut dengan pengembangan kromatogram. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan, fase diam diambil, fase gerak yang terjebak dalam fase diam dikeringkan dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung (visual) atau di bawah sinar ultraviolet (UV) baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang cocok (Wulandari, 2011).

Perbedaan migrasi merupakan hasil dari perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen dalam fase diam dan fase gerak. Berbagai mekanisme pemisahan terlibat dalam penentuan kecepatan migrasi. Kecepatan migrasi komponen sampel tergantung pada sifat fisika kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel. Retensi dan selektivitas kromatografi juga ditentukan oleh interaksi antara fase diam, fase gerak dan komponen sampel yang berupa ikatan hidrogen, pasangan elektron

donor atau pasangan elektron akseptor, ikatan ion-ion, ikatan ion-dipol dan ikatan van der Waals (Wulandari, 2011).

2.4.2 Sifat Fisika Kimia Analit

Menurut Wulandari (2011), sebelum melakukan preparasi sampel, terlebih dahulu harus diketahui sifat fisika kimia analit yang akan dianalisis. Sifat fisika kimia analit yang perlu diketahui adalah kelarutan dan stabilitas analit. Dari data kelarutan dapat dipilih pelarut untuk preparasi sampel. Sedangkan stabilitas analit menentukan cara preparasi sampel. Seperti misalnya analit yang tidak stabil pada suhu tinggi, dihindari adanya pemanasan pada preparasi sampel.

2.4.3 Analisis Kualitatif

Analisis kualitatif suatu analit dalam KLT dilakukan dengan cara membandingkan noda kromatogram analit tersebut dengan noda zat standar (*reference standard*) yang dikenal sebagai *retardation factor* (*Rf*) (Sherma & Fried, 2003). *Rf* adalah parameter yang digunakan untuk menggambarkan migrasi senyawa dalam KLT. Penentuan harga *Rf* analit dilakukan dengan cara membandingkan jarak migrasi noda analit dengan jarak migrasi fase gerak atau eluen. *Rf* dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$Rf = \frac{\text{Jarak migrasi analit}}{\text{Jarak migrasi eluen}} \dots\dots\dots(2.1)$$

Nilai *Rf* berkisar antara 0 dan 1 dan nilai *Rf* terbaik antara 0,2-0,8 untuk deteksi UV dan 0,2-0,9 untuk deteksi *visible*. Dengan mengontrol kondisi kesetimbangan seperti kejenuhan *chamber*, komposisi campuran pelarut yang konstan, temperatur konstan dan lain-lain akan didapat nilai *Rf* yang reproduksibel (Wulandari, 2011).

2.4.4 Analisis Kuantitatif

Ada dua metode kuantitasi analit dalam KLT. Pertama melibatkan sejumlah cara pengukuran langsung pada lempeng, seperti pengukuran luas, perbandingan keterlihatan, atau densitometri. Kedua melibatkan pengerokan analit dari lempeng, diikuti dengan tahap kuantitasi. Pendekatan densitometri menyediakan pengukuran analit pada lempeng dengan peka, teliti dan reproduusibel (Munson, 1991). Penentuan langsung noda kromatogram dilakukan dengan cara membandingkan area noda sampel dengan area noda standar pada pelat KLT dengan menggunakan alat densitometri (Sherma & Fried, 2003).

2.4.5 Fase Diam

Keberhasilan pemisahan campuran kompleks dengan KLT sangat tergantung pada pemilihan fase diam (sorben). Sorben yang umumnya digunakan pada KLT adalah sorben dengan ukuran partikel 12 μm yang terdiri dari silika gel, alumina, silika gel ikatan kimia, selulosa, poliamida, polimer penukar ion dan silika gel terimpregnasi. Silika gel adalah sorben yang paling banyak digunakan pada KLT dan sebagian besar analisis dengan KLT menggunakan silika gel fase normal (Gocan, 2002).

Fase diam yang digunakan dalam KLT (lempeng) bersifat rapuh dan harus ditangani dengan benar mulai dari pembukaan kemasan sampai dengan dokumentasi. Berikut ini adalah beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam penanganan lempeng KLT.

a. Pemotongan Lempeng

Pemotongan lempeng dengan pendukung aluminium foil dapat dilakukan dengan gunting, dimana pemotongan harus memperhatikan sudut gunting pada saat pemotongan dilakukan. Sudut gunting tidak boleh cenderung kekiri karena akan menyebabkan lepasnya sorben dari pendukungnya. Hal ini akan berefek pada

ketidakteraturan pergerakan eluen pada saat eluasi sehingga mempengaruhi kromatogram yang dihasilkan (Wulandari, 2011).

b. Pencucian Lempeng

Teknik pencucian lempeng KLT diperlukan untuk menghilangkan pengotor lempeng baik itu pengotor yang berasal dari bahan pengikat lempeng maupun dari atmosfer yang teradsorpsi ke dalam lempeng. Adanya pengotor dalam lempeng akan bermasalah jika pengotor tersebut terdeteksi oleh pereaksi penampak noda yang digunakan ataupun oleh lampu deteksi yang digunakan (Wulandari, 2011).

c. Aktivasi Lempeng

Aktivasi lempeng bertujuan untuk menghilangkan kelembaban air atmosfer yang teradsorpsi dalam lempeng. Pada kromatografi adsorpsi, aktivitas lempeng yang tinggi dapat meningkatkan ketertambatan fase diam sehingga jarak migrasi sampel menjadi lebih pendek. Untuk mendapatkan reproduibilitas nilai ketertambatan (faktor retardasi) diperlukan penentuan tingkat aktivasi lempeng yang baik (Wulandari, 2011).

d. Pengkondisian Lempeng (*Conditioning*)

Pengkondisian lempeng ditujukan untuk mengontrol kelembabapan lempeng dalam chamber. Pengaruh pengkondisian lempeng adalah pada nilai faktor retardasi dan resolusi pemisahan pada kromatogram yang dihasilkan (Wulandari, 2011).

e. Impregnasi Lempeng

Impregnasi lempeng dilakukan untuk mengubah sorben fase diam dengan menggunakan senyawa anorganik maupun senyawa organik. Impregnasi dapat dilakukan dengan cara pencelupan, penyemprotan maupun dengan pra elusi dengan pelarut pengimpregnasi (Wulandari, 2011).

2.4.6 Fase Gerak

Pemilihan fase gerak (eluen) adalah faktor yang sangat berpengaruh pada kromatogram KLT. Hanya beberapa kasus yang menggunakan fase gerak dengan 1 komponen. Normalnya, digunakan campuran sampai dengan 6 komponen. Campuran harus saling larut dan tidak ada tanda-tanda kekeruhan. Fungsi eluen adalah :

- a. Untuk melarutkan campuran zat
- b. Untuk membawa komponen yang akan dipisahkan melewati sorben fase diam
- c. Untuk memberikan nilai R_f yang berada ditengah-tengah rentang atau mendekati persyaratan
- d. Untuk memberikan selektivitas yang memadai untuk campuran senyawa yang akan dipisahkan (Deinstrop, 2007).

Pada sorben dengan prinsip pemisahan berdasarkan polaritas dibutuhkan nilai koefisien partisi (P atau $\log P$) dan tetapan disosiasi (pK_a) analit dalam penentuan eluen. Nilai koefisien partisi analit digunakan untuk menentukan afinitas analit terhadap fase diam dan fase gerak. Nilai tetapan disosiasi (pK_a) digunakan untuk menentukan bentuk analit (ion atau molekul) pada pH lingkungan tempat analit berada (Wulandari, 2011).

Pencarian eluen berdasarkan pustaka yang ada juga dapat membantu tahapan optimasi eluen. Eluen dari pustaka dapat dimodifikasi untuk mendapatkan pemisahan yang efisien. Bila noda yang dihasilkan belum bagus (Noda masih berekor atau belum simetris), eluen dapat dimodifikasi dengan menambahkan sedikit asam atau basa sehingga merubah pH eluen (Wulandari, 2011).

2.4.7 Aplikasi Sampel (Penotolan)

Aplikasi sampel pada KLT merupakan faktor yang penting untuk pemisahan kromatografi yang baik. Sebagai aturan yang umum, penggunaan pelarut polar atau campuran dimana pelarut dapat melarutkan analit atau dapat mengekstraksi analit

dapat membantu dalam mendapatkan ukuran spot yang kecil yaitu 1-5 μl untuk KLT. Hal lain yang juga perlu diperhatikan dalam aplikasi sampel adalah jumlah sampel yang ditotolkan pada fase diam dimana jika penotolan dalam jumlah berlebih akan terjadi *overload*. Pada kondisi ini spot akan bermigrasi selama pengembangan dan menyebabkan terjadinya bentuk spot seperti komet setelah pengembangan. Hal ini dapat menurunkan resolusi (Wall, 2005). Pada aplikasi sampel secara manual, volume sampel yang diaplikasikan tergantung dari objek percobaan dan konsentrasi sampel. Untuk uji identitas biasanya digunakan 0,5 μl - 2,0 μl sedangkan untuk uji kemurnian suatu kandungan digunakan tidak lebih dari 10 μl (Deinstrop, 2007).

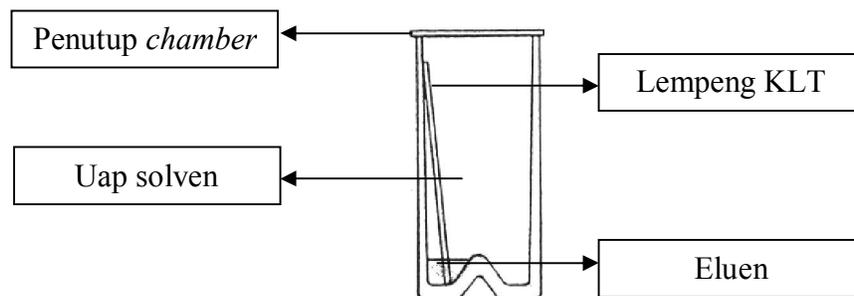
2.4.8 Elusi (Pengembangan)

Elusi atau pengembangan KLT dipengaruhi oleh *chamber* yang digunakan dan kejenuhan dalam *chamber*. Jenis *chamber* harus diperhatikan untuk menentukan teknik pengembangan yang akan digunakan. Dalam *chamber* terjadi beberapa hal yaitu kejenuhan uap pelarut, adsorpsi uap pelarut oleh sorben lempeng KLT, munculnya efek tepi yang disebabkan oleh ketidakseimbangan gaya kapilaritas pada sisi tengah dengan sisi tepi lempeng KLT. Hal-hal tersebut sangat mempengaruhi proses pemisahan, oleh karena itu modifikasi fitur pada *chamber* dilakukan untuk menghilangkan efek yang tidak diinginkan dan memperbaiki resolusi pemisahan (Wulandari, 2011). Ada beberapa jenis *chamber* KLT dimana masing-masing dirancang dengan fitur khusus untuk mengontrol reproduktibilitas pengembangan KLT. Adapun jenis-jenis *chamber* KLT yaitu :

- a. *Chamber* Nu (*chamber* normal, alas datar, tak jenuh)
- b. *Chamber* Ns (*chamber* normal, alas datar, jenuh)
- c. *Chamber* Twin-trough (*chamber* dengan dua kompartemen tempat eluen)
- d. *Chamber* Su (*chamber* sandwich tak jenuh)
- e. *Chamber* Ss (*chamber* sandwich, jenuh)
- f. *Chamber* horizontal (jenuh, tak jenuh)

g. *Chamber* elusi otomatis (Wall, 2005).

Pengembangan lempeng KLT atau elusi kebanyakan dilakukan dengan model *ascending* (menaik) dengan memanfaatkan efek kapiler dari fase diam. Dalam pembentukan suasana jenuh, fase gerak dituangkan ke dalam bejana lalu dinding bejana diberi kertas saring. Bejana ditutup hingga kertas saring terbasahi sempurna oleh eluen yang menunjukkan bahwa telah terjadi kesetimbangan uap. Setelah jenuh bejana dibuka dan lempeng dengan area awal tertotol dimasukkan, dan wadah segera ditutup lagi. Bejana tak terjenuhkan biasanya menghasilkan harga R_f lebih besar dan efisiensi lebih kecil (Sherma & Fried, 2003). Proses pengembangan lempeng KLT dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Proses pengembangan lempeng KLT (Wall, 2005)

Proses pengembangan dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu :

a. Pengembangan satu dimensi

Dalam cara ini pengembangan berjalan hanya satu arah dengan menggunakan satu macam sistem pelarut.

b. Pengembangan dua dimensi

Pengembangan dua dimensi dilakukan dengan cara lempeng dielusi dengan eluen pertama. Setelah elusi selesai lempeng dikeringkan kemudian dielusi kembali dengan eluen kedua dengan arah migrasi eluen berbeda. Eluen kedua dapat

berupa eluen yang sama dengan eluen pertama atau eluen yang berbeda dari eluen pertama (Wulandari, 2011).

2.4.9 Evaluasi Noda

Setelah pengembangan kromatogram selesai, biasanya dilakukan beberapa visualisasi zona kromatografi yang dibutuhkan karena sebagian besar senyawa tidak tampak berwarna. Banyak senyawa yang akan menyerap sinar UV atau berfluoresensi ketika diberi sinar UV atau cahaya tampak, tetapi sebagian besar membutuhkan visualisasi menggunakan penyemprotan atau pencelupan reagen (Wall, 2005). Adapun teknik yang dapat dilakukan untuk evaluasi noda yaitu :

a. Teknik Non-Destruktif

Salah satu contoh teknik non-destruktif adalah deteksi dengan ultra-violet. Pemisahan zona kromatografi lapisan KLT mungkin muncul berwarna di cahaya normal, tetapi dapat menyerap radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang yang lebih pendek. Hal ini sering terdeteksi dalam rentang UV, biasanya 200-400 nm (Wall, 2005).

b. Teknik Destruktif

Reaksi kimia yang muncul pada lempeng KLT antara pereaksi dan analit merupakan hasil derivatisasi atau hasil perubahan total senyawa organik yang disebut sebagai destruktif. Teknik utama yang dapat dilakukan pada teknik destruktif ini adalah pembakaran dan aktivasi termal (Wall, 2005).

2.4.10 Efisiensi Kromatografi

Pemilihan kondisi analisis yang akan digunakan dapat dilihat berdasarkan penilaian parameter efisiensi sistem kromatografi. Adapun parameter yang menentukan efisiensi kromatogram tersebut antara lain: nilai resolusi (R_s), nilai *theoretical plate* / lempeng teori (N), dan nilai *Height equivalent of teoritical plate* (H).

a. Resolusi (R_s)

Resolusi merupakan kemampuan kondisi analisis untuk memisahkan dua senyawa dalam sampel. Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut.

$$R_s = \frac{2[(Z)_A - (Z)_B]}{W_A + W_B} \dots\dots\dots (2.2)$$

dimana :

R_s = pemisahan antara dua puncak kromatogram (zat A dan zat B),

$(Z)_A$ = jarak migrasi zat A,

$(Z)_B$ = jarak migrasi zat B,

W_A = lebar dasar puncak zat A,

W_B = lebar dasar puncak zat B.

Resolusi analit dengan zat lain sebaiknya lebih dari 1,5. Semakin besar nilai resolusi semakin baik pemisahan yang terjadi. Apabila resolusi kromatografi kecil yaitu kurang dari 1,5 maka metode tersebut perlu dilakukan evaluasi kondisi analisis yang digunakan.

b. Nilai *Theoretical Plate* atau Lempeng Teori (N)

Nilai ini merupakan nilai atau angka pelebaran zona yang menunjukkan satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam. Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut.

$$N = 16 \left[\frac{Z_s}{W} \right]^2 \dots\dots\dots (2.3)$$

dimana :

N = nilai pelebaran zona untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam,

W = lebar dasar puncak,

Z_s = jarak migrasi analit.

c. Nilai *Height Equivalent of Teoritical Plate* (H)

Nilai ini merupakan panjang jarak tempuh eluen yang dibutuhkan sampai terjadinya satu kali kesetimbangan dalam fase gerak dan fase diam. Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut.

$$H = \left[\frac{Z_f}{N} \right]^2 \dots\dots\dots (2.4)$$

dimana :

H = jarak tempuh atau migrasi analit untuk satu kali kesetimbangan dalam fase diam dan fase gerak,

N = nilai pelebaran zona untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam,

Z_f = jarak migrasi fase gerak

(Wulandari, 2011)

2.5 Tinjauan Tentang Densitometri

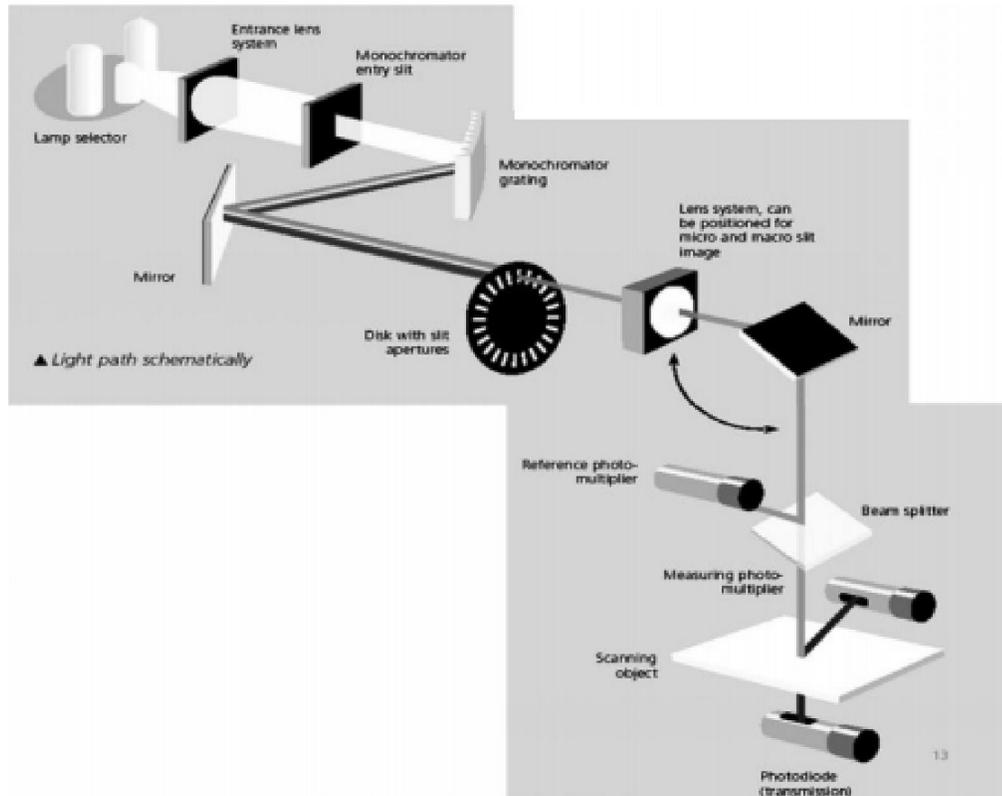
Densitometri berarti mengukur konsentrasi zona kromatografi pada pelat KLT tanpa mengganggu pemisahan analit. Walaupun dulu merupakan unit yang berdiri sendiri, saat ini telah dikendalikan oleh komputer yang memberikan hasil reproduibel dan akurat (Wall, 2005). Instrumen densitometri dapat dilihat pada Gambar 2.4 berikut.



Gambar 2.4 Instrumen densitometri (Wall, 2005)

Densitometri dapat digunakan untuk analisis instrumental penentuan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT. Metode ini biasa disebut metode KLT Densitometri. REM merupakan intensitas cahaya yang mengenai molekul senyawa dalam noda. REM dengan noda pada fase diam KLT menentukan intensitas cahaya yang diabsorpsi, ditransmisi, dipantulkan (refleksi) oleh noda analit dari intensitas REM semula. Penentuan kualitatif analit KLT Densitometri dilakukan dengan cara membandingkan nilai Rf analit dan standar. Dari noda analit yang memiliki Rf yang sama dengan standar diidentifikasi kemurnian analit dengan cara membandingkan spektrum densitometri analit dan standar. Sedangkan penentuan kuantitatif analit dilakukan dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standar pada fase diam yang diketahui konsentrasinya atau menghitung densitas noda analit atau membandingkannya dengan densitas noda standar (Wulandari, 2011).

Skema sistem optik densitometri dapat dilihat pada Gambar 2.5. Sumber radiasi yang digunakan dapat dipilih yaitu sinar UV (lampu deuterium), sinar VIS (lampu tungsten) dan sinar fluoresensi (lampu merkuri). Sinar yang dipancarkan berupa sinar polikromatik masuk melewati celah monokromator. Di dalam monokromator sinar didispersikan menjadi sinar monokromatik dengan teknik grating. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih keluar melalui celah keluar monokromator. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih dipantulkan melalui cermin sehingga mengenai objek (lempeng KLT). Sinar yang datang dapat dipantulkan maupun diteruskan. Sinar yang dipantulkan atau diteruskan ditangkap oleh pengganda foton (*photomultiplier*) berfungsi untuk menggandakan sinar yang datang sehingga dihasilkan elektron yang terbaca oleh sistem komputer sebagai data output (Wulandari, 2011).



Gambar 2.5 Skema sistem optik densitometer (Wall, 2005)

2.6 Optimasi Kondisi Analisis

Prinsip kromatografi adalah pemisahan analit dari campuran dimana perlu dilakukan optimasi proses kromatografi untuk dapat meningkatkan kualitas pemisahan dengan cara mengubah satu atau lebih parameter dari sistem kromatografi (Kowalska & Prus, 2003). Optimasi yang perlu dilakukan adalah optimasi kondisi analisis karena untuk mendapatkan pemisahan yang baik harus digunakan kondisi analisis yang optimum. Pemilihan kondisi analisis yang akan digunakan dapat dilihat berdasarkan penilaian parameter efisiensi sistem kromatografi. Adapun parameter yang menentukan efisiensi kromatogram tersebut, antara lain: nilai R_s , nilai N , dan H (Wulandari, 2011).

2.7 Tinjauan Tentang Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu proses yang dilakukan dengan pengujian di laboratorium untuk menunjukkan kinerja metode memenuhi persyaratan untuk dimaksudkan dalam aplikasi analitis. Oleh karena itu, validasi merupakan langkah penting yang harus dilakukan untuk menentukan reliabilitas dan reproduisibilitas dari suatu metode karena bisa mengetahui apakah suatu metode bisa dilakukan pada suatu sistem tertentu (Indrayanto & Yuwono, 2003).

2.7.1 Linieritas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita, 2004). Untuk pengujian linieritas, direkomendasikan menggunakan 5-10 konsentrasi standar dengan rentang 80-120%, 25-200% atau 50-150% dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto & Yuwono, 2003).

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier $Y = a + bX$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita, 2004). Penggunaan nilai r saja sebagai parameter linieritas tidak digunakan lagi karena nilai r tidak mengindikasikan linieritas. Sehingga harus ditambah dengan parameter lain seperti nilai standar deviasi (V_{x_0}) dan X_p (Indrayanto & Yuwono, 2003).

2.7.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. 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 (Harmita, 2004). Penentuan BD dan BK dapat dilakukan dengan menggunakan 5-10 tingkat konsentrasi analit yang relatif rendah (Indrayanto & Yuwono, 2003). Menurut ICH (*International Conference on Harmonization*) (1994), penentuan BD dan BK dapat menggunakan 4 cara yaitu :

a. Metode *Sinyal to Noise*

Batas Deteksi adalah konsentrasi yang menghasilkan puncak dengan ketinggian minimal dua atau tiga kali lebih tinggi dari noise.

b. Inspeksi Visual

Batas Deteksi ditentukan oleh analisis sampel yang berisi konsentrasi analit dan batas deteksi merupakan konsentrasi minimum dimana analit masih terdeteksi.

c. Standar Deviasi dari Respon Berdasarkan Standar Deviasi Blangko

Pengukuran besarnya respon latar belakang analisis dilakukan dengan menganalisis blangko dan menghitung standar deviasi dari respon blangko. Selain itu, batas deteksi dan batas kuantitasi juga dapat ditentukan dari rasio standar deviasi respon blangko menggunakan standar deviasi residual dari garis kalibrasi atau standar deviasi *intercept* (s) dan *slope* (S) melalui rumus :

$$\text{Batas deteksi} = 3,3 \frac{s}{S} \dots\dots\dots (2.5)$$

$$\text{Batas kuantitasi} = 10 \frac{s}{S} \dots\dots\dots (2.6)$$

d. Standar Deviasi dari Respon Berdasarkan Kemiringan Kurva Kalibrasi

Sebuah kurva kalibrasi tertentu dievaluasi dengan menggunakan larutan yang mengandung analit dalam kisaran batas deteksi. Residual standar deviasi dari garis regresi atau standar deviasi dari intersep dari y dapat digunakan sebagai standar deviasi. Pada pendekatan ini, nilai parameter linieritas seperti r, V_{xo} dan X_p harus terpenuhi terlebih dahulu.

2.7.3 Selektivitas /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 (Harmita, 2004). Tujuan dilakukan pengujian ini adalah untuk menunjukkan bahwa suatu metode tidak memberikan respon yang positif terhadap senyawa atau analit lain (McPolin, 2009).

Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s) dimana nilai R_s sebaiknya lebih dari 1,5 (Harmita, 2004). Parameter untuk mengetahui spesifisitas metode dapat ditentukan berdasarkan pengamatan identitas (*identity*) dan kemurnian (*purity*) analit dalam sampel. Uji kemurnian spektra diambil dari lereng puncak pertama berkolerasi dengan puncak maksimum spektra. Kolerasi ini diidentifikasi sebagai $r(s,m)$ pada winCATS, dengan s menunjukkan mulai puncak dan m puncak maksimum. Korelasi dari spektra diambil pada puncak maksimum dengan salah satu lereng bawah atau akhir puncak, di winCATS bernama $r(m,e)$, dengan m menunjukkan puncak maksimum dan e merupakan akhir puncak (Indrayanto & Yuwono, 2003).

2.7.4 Presisi

Presisi atau keseksamaan 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 (Harmita, 2004). Pada penentuan presisi dapat dilakukan pada 3 kategori yaitu :

a. Repeatabilitas

Repeatabilitas (*Intra-assay precision*) menunjukkan presisi dibawah kondisi percobaan yang sama meliputi laboratorium, analisis serta peralatan yang dilakukan pada waktu yang singkat. Repeatabilitas dapat dinilai dengan pengukuran minimal 9 kali yang mencakup kisaran yang digunakan dalam prosedur analisis (misalnya 3 konsentrasi/3 replikasi) atau dapat dinilai dengan suatu pengukuran sebanyak minimal 6 kali pada 100% dari konsentrasi uji (ICH, 1994).

b. Presisi Antara

Presisi antara menunjukkan presisi yang dilakukan pada hari yang berbeda atau oleh analis yang berbeda atau dapat juga dilakukan dengan peralatan yang berbeda namun dalam laboratorium yang sama (ICH, 1994).

c. Reprodusibilitas

Reprodusibilitas menunjukkan presisi yang dilakukan pada laboratorium yang berbeda biasanya untuk menstandarisasi metode (untuk verifikasi bahwa metode tersebut memberikan hasil yang sama dengan menggunakan fasilitas yang berbeda) (ICH, 1994).

Dari ketiga kategori di atas, yang wajib dilakukan adalah repeatibilitas dan presisi antara (Indrayanto & Yuwono, 2003). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 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 (Harmita, 2004). Menurut AOAC (1998), kriteria presisi penerimaan uji presisi ditunjukkan pada Tabel 2.1 di bawah ini.

Tabel 2.1 Konsentrasi analit berbanding %RSD

Analit (%)	Unit	RSD (%)
100	100%	1,3
10	10%	1,9
1	1%	2,7
0,01	0,1%	3,7
0,001	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,0001	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,00001	1 ppm (mg/kg)	11
0,000001	100 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	15
0,0000001	10 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	21
0,00000001	1 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	30

Sumber : AOAC (1998)

2.7.5 Akurasi

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Akurasi dapat ditentukan dengan dua metode, yaitu:

- a. Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*), yaitu pengukuran sejumlah analit bahan murni yang ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang sebenarnya. Penentuan persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 80%-120% dari kadar analit yang diperkirakan.
- b. Metode penambahan standar atau pembandingan (*standard addition method*), yaitu menambahkan sejumlah tertentu analit dalam sampel yang telah dianalisis untuk selanjutnya dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Penambahan analit ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 30%-60% kali dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto & Yuwono, 2003).

$$\% \text{ Perolehan Kembali} = \frac{C_F - C_A}{C_A^*} \times 100 \dots\dots\dots (2.7)$$

Keterangan :

C_F = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A = konsentrasi sampel sebenarnya

C_A^* = konsentrasi analit yang ditambahkan (Harmita, 2004).

Rentang nilai *mean recovery* yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada tabel 2.2 dibawah ini.

Tabel 2.2. Persen perolehan kembali (% *recovery*) analit pada konsentrasi yang berbeda

Analit (%)	Unit	<i>Mean Recovery</i> (%)
100	100%	98-102
10	10%	98-102
1	1%	97-103
0,01	0,1%	95-105
0,001	100 ppm (mg/kg)	90-107
0,0001	10 ppm (mg/kg)	80-110
0,00001	1 ppm (mg/kg)	80-110
0,000001	100 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	80-110
0,0000001	10 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	60-115
0,00000001	1 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	40-120

Sumber : AOAC (1998)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *True Experimental Laboratories* yang merupakan penelitian yang dilakukan di laboratorium.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari bulan Agustus 2014 bertempat di Laboratorium Kimia Farmasi dan Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Pohon kopi robusta yang tumbuh di perkebunan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia yang berlokasi di Jalan Perkebunan Renteng PTPN XII Kecamatan Jenggawah, Kabupaten Jember.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kopi robusta (*Coffea canephora*) tua dan muda. Daun tua adalah daun yang berwarna hijau tua dan teksturnya kasar yang tumbuh pada cabang *plagiotrop* yang terletak di bagian tengah pohon kopi robusta. Sedangkan daun muda adalah daun yang berwarna hijau terang atau hijau muda dan teksturnya lembut yang tumbuh pada cabang *plagiotrop* yang terletak di bagian tengah pohon kopi robusta (Salgado *et al.*, 2008).

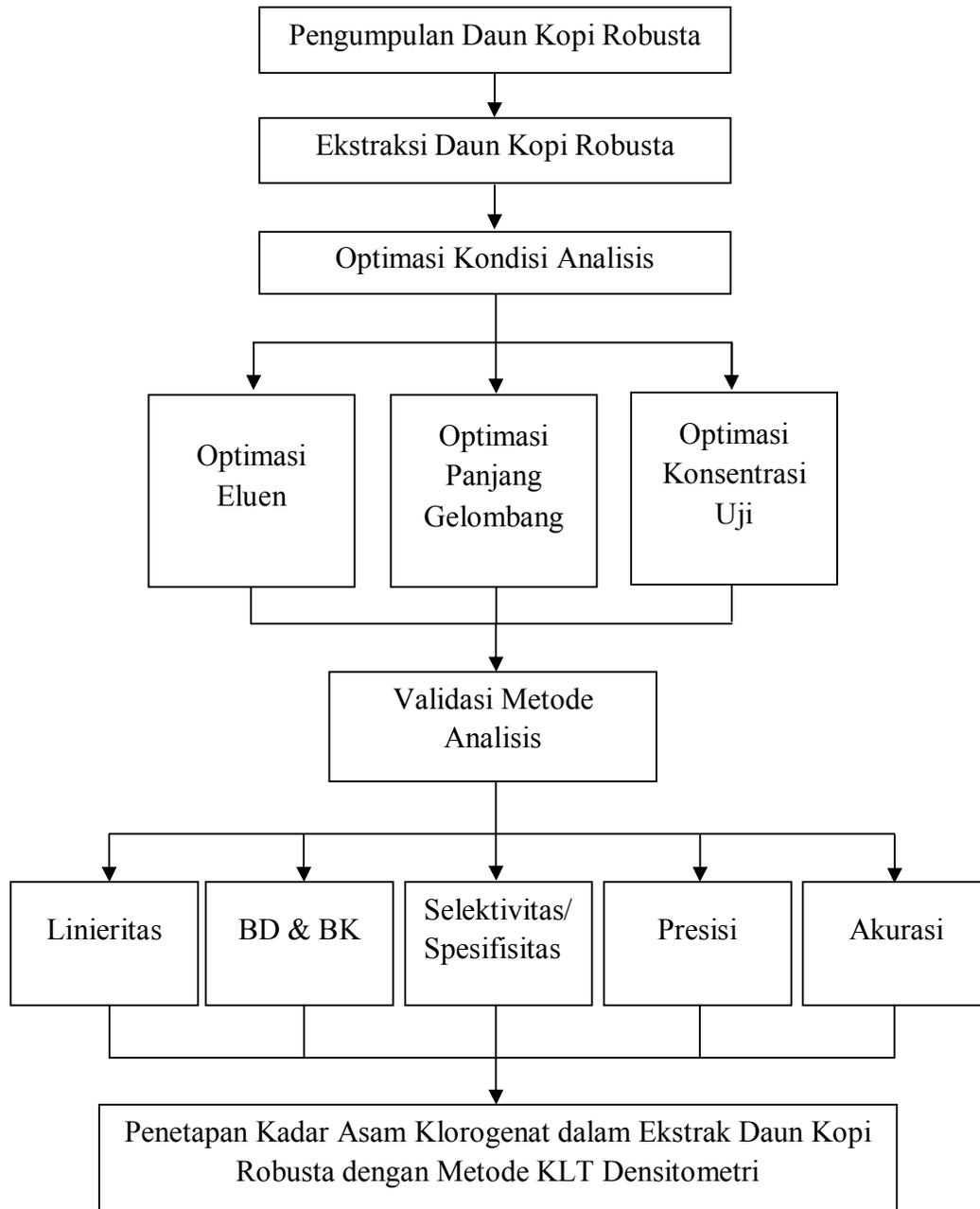
3.4 Rancangan Penelitian

3.4.1 Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode dan penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta menggunakan metode KLT Densitometri. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu tahap pertama dilakukan optimasi kondisi analisis untuk memperoleh kondisi optimum untuk analisis. Selanjutnya dilakukan validasi metode analisis dengan variabel analisa meliputi linieritas, Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi (BD & BK), selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi. Setelah metode valid, kemudian dilakukan penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta tua dan muda.

3.4.2 Alur Penelitian

Alur pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1 Diagram alur penelitian analisis kuantitatif asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta dengan metode KLT densitometri

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserator, oven, *hot plate*, *rotary evaporator* (Heidolph), *scanner* Densitometer (Camag), perangkat komputer dengan program winCATS, *ultrasonic degasser* (elma), lampu Ultra Violet (UV), timbangan analitik (Sartorius), bejana (*chamber*) (Camag), penghalus serbuk, kulkas, botol ekstrak cair, gelas ekstrak, corong gelas, cawan porselen, labu ukur (10 mL dan 25 mL) pyrex, erlenmeyer 100 mL pyrex, *beaker glass* (50 ml dan 100 ml), pipet volume (0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 10 mL) pyrex, *ball filler*, batang pengaduk, spatula, pipet tetes, botol timbang, pipa kapiler, *blower*, mikropipet dan vial.

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah lempeng KLT Silika Gel 60 F₂₅₄, standar Asam Klorogenat (Sigma-Aldrich), daun kopi robusta tua dan muda, kertas saring, aquadest, metanol p.a (Sigma-Aldrich), aquabides (WIDA WI™ Unicap), etil asetat, asam format, diklorometan dan asam asetat.

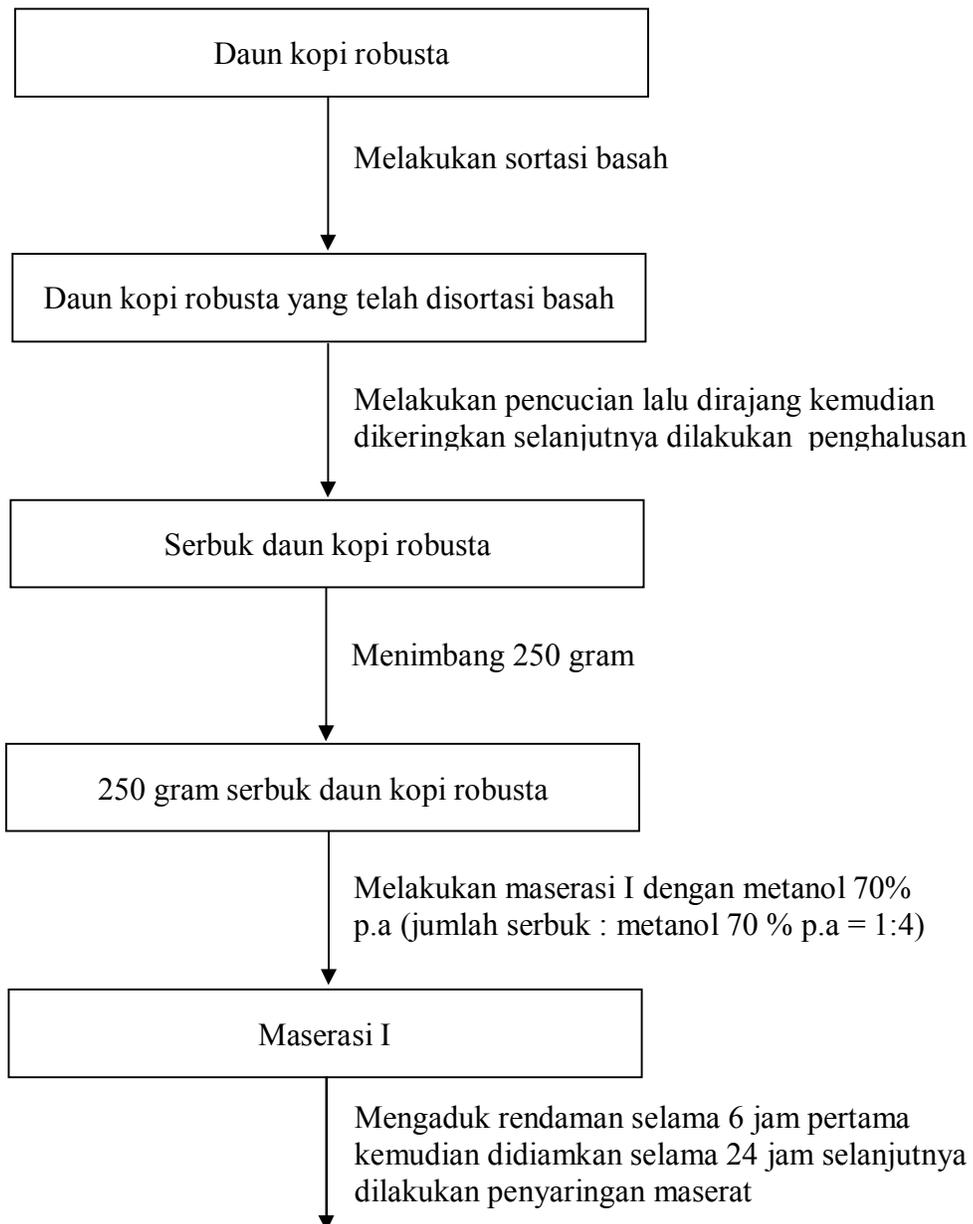
3.6 Pengumpulan Sampel

Peneliti mengambil sampel di perkebunan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia yang berlokasi di Jalan Perkebunan Renteng PTPN XII Kecamatan Jenggawah, Kabupaten Jember yang merupakan salah satu penghasil kopi terbesar di Kabupaten Jember.

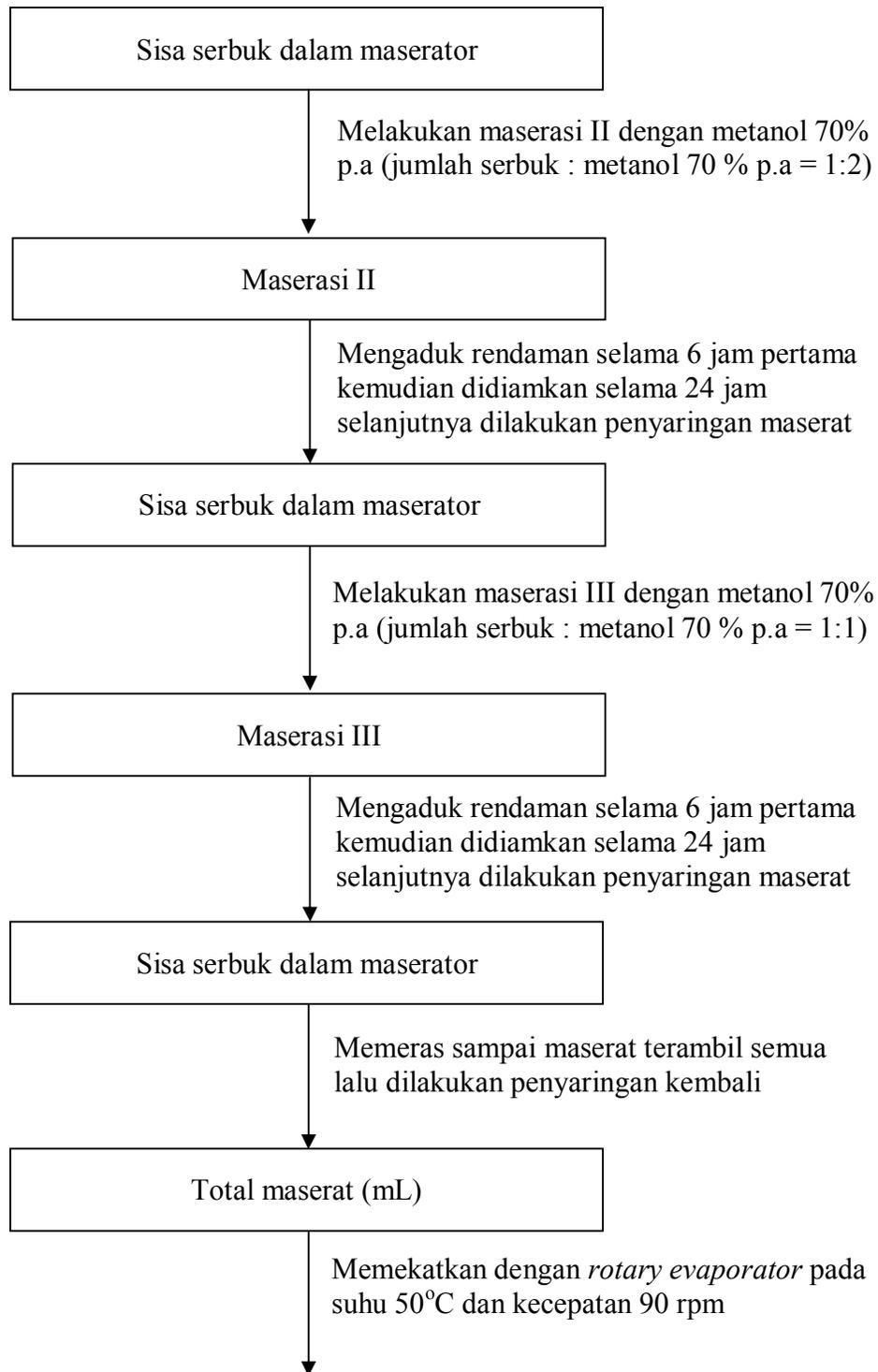
Pengumpulan sampel dilakukan berdasarkan tujuan peneliti yaitu memvalidasi metode dan menetapkan kadar asam klorogenat pada daun kopi robusta. Oleh karena itu digunakan sampel daun kopi robusta tua dan muda dimana daun kopi robusta tua digunakan untuk validasi metode dan setelah metode valid, penetapan kadar asam klorogenat dilakukan pada kedua jenis daun kopi robusta ini.

3.7 Pembuatan Ekstrak Daun Kopi Robusta

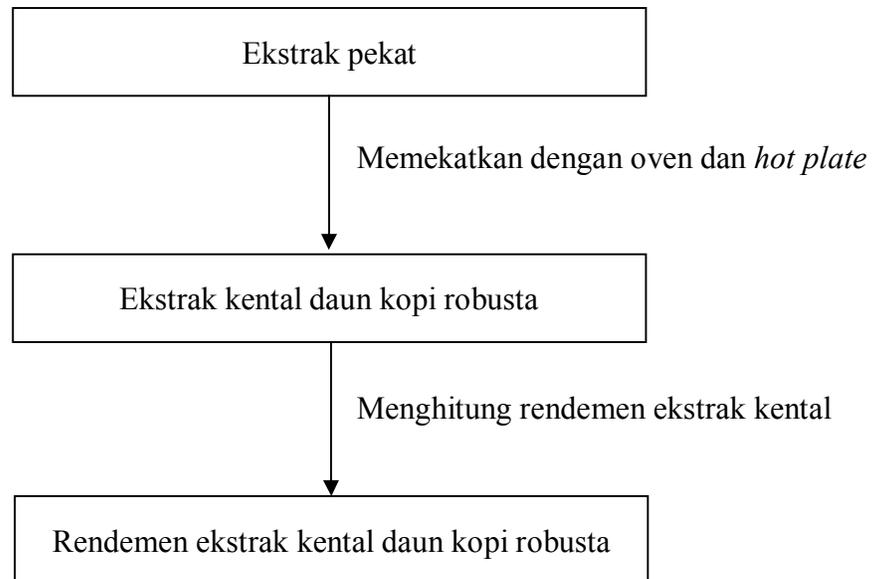
Proses ekstraksi daun kopi robusta tua dan muda dilakukan dengan cara yang sama yaitu dengan remaserasi.



lanjutan.



lanjutan.



(Farmakope Herbal Indonesia, 2009).

3.8 Optimasi Kondisi Analisis

Kondisi analisis yang perlu dioptimasi pada metode ini meliputi optimasi fase gerak/eluen, panjang gelombang, dan konsentrasi uji analit.

3.8.1 Optimasi Eluen

Eluen yang digunakan untuk optimasi eluen didasarkan pada penelitian sebelumnya (Urakova *et al.*, 2008) yaitu dengan komposisi sebagai berikut.

- a. Etil asetat : diklorometan : asam format : asam asetat : aquabides = 100:25:10:10:11
- b. Asam format : etil asetat : aquabides = 1:8:1
- c. Asam format : etil asetat : aquabides = 1:8:1,5

Eluen yang diambil dari penelitian yang dilakukan oleh Urakova *et al.* (2008) yaitu seperti yang tertera pada subbab optimasi eluen poin a. Kemudian dilakukan

modifikasi seperti poin b dan c. Pada modifikasi ini dilakukan penghilangan asam asetat dan diklorometan serta perubahan perbandingan komposisi eluen. Pemilihan etil asetat dan penghilangan asam asetat dilakukan karena kedua senyawa ini memiliki polaritas yang hampir sama sehingga dipilih salah satu. Penghilangan diklorometan dilakukan untuk meningkatkan kepolaran eluen.

Eluen yang paling optimum didasarkan pada parameter efisiensi kromatogram yang meliputi nilai N (*Theoretical Plate Number*) yang paling besar, nilai H (*Height Equivalent A Theoretical Plate*) yang terkecil, nilai R_f (*Retardation factor*) antara 0,2-0,8 (Wulandari, 2011) dan menghasilkan kromatogram dengan satu puncak yang simetris.

3.8.2 Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan scanning noda analit pada Camag *TLC Scanner* (Densitometri) dan *software* program winCATS. Penilaian panjang gelombang maksimal dilakukan pada area panjang gelombang antara 200-700 nm. Penilaian panjang gelombang optimum dipilih berdasarkan pada panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum yang paling tinggi.

3.8.3 Optimasi Konsentrasi Uji

Optimasi konsentrasi uji dilakukan pemilihan konsentrasi uji 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm dan 150 ppm. Pemilihan ini didasarkan pada hasil optimasi yang menunjukkan perkiraan kandungan asam klorogenat pada daun kopi robusta yang terbilang kecil. Dengan demikian untuk mempermudah preparasi sampel, konsentrasi uji yang digunakan untuk optimasi adalah tingkat konsentrasi yang rendah.

Prosedur Optimasi :

Membuat larutan standar asam klorogenat dengan melarutkan asam klorogenat dalam metanol sehingga didapatkan konsentrasi yang akan dioptimasi. Sedangkan untuk larutan sampel dibuat dengan cara menimbang sejumlah tertentu

sampel kemudian dilarutkan dalam metanol sehingga larutan mengandung asam klorogenat dengan konsentrasi sesuai dengan yang akan dioptimasi. Kemudian masing-masing larutan dimasukkan ke dalam vial. Setelah itu larutan standar dan sampel ditotolkan pada lempeng KLT Silika Gel 60 F₂₅₄ masing-masing 2 μ l dengan pipa kapiler. Setelah penotolan selesai, lempeng diangin-anginkan untuk menguapkan pelarut.

Eluen dipreparasi dengan komposisi sesuai dengan hasil optimasi kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah berisi kertas saring lalu *chamber* ditutup dan dibiarkan hingga jenuh (kertas saring terbasahi semua). Lempeng KLT yang telah ditotol dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh dan ditunggu hingga eluasi mencapai tanda batas. Kemudian lempeng diangin-anginkan sampai kering lalu noda yang terbentuk *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Penilaian konsentrasi analit yang paling optimum berdasarkan parameter efisiensi kromatogram yaitu nilai N yang paling besar, nilai H terkecil serta kemudahan dalam preparasi sampel.

3.9 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis penentuan asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta dengan KLT Densitometri meliputi berbagai parameter yaitu : linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.

3.9.1 Linieritas

Membuat larutan standar asam klorogenat dalam metanol dengan 8 tingkat konsentrasi dalam rentang 25-200% dari konsentrasi uji hasil optimasi. Larutan standar dibuat dengan menimbang sejumlah tertentu standar asam klorogenat kemudian dilarutkan dengan metanol di dalam labu ukur, lalu diencerkan sejumlah tertentu sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi yang diinginkan. Larutan standar yang telah dibuat dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditotolkan pada

lempeng KLT Silika Gel 60 F₂₅₄ masing-masing 2 μ L dengan pipa kapiler. Setelah penotolan selesai, lempeng diangin-anginkan untuk menguapkan pelarut.

Eluen dipreparasi dengan komposisi sesuai dengan hasil optimasi, kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah berisi kertas saring lalu *chamber* ditutup dan dibiarkan hingga jenuh (kertas saring terbasahi semua). Lempeng KLT yang telah ditotol dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh dan ditunggu hingga eluasi mencapai tanda batas. Kemudian lempeng diangin-anginkan sampai kering lalu noda yang terbentuk *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai parameter linieritas dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis*. Kriteria penerimaan (*Acceptance Criteria*) suatu metode dikatakan linier jika koefisien korelasi ($r \geq 0,99$); Koefisien variasi fungsi (V_{xo}) < 5% serta nilai X_p lebih kecil dari konsentrasi terkecil yang digunakan (Indrayanto & Yuwono, 2003).

3.9.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Penentuan BD dan BK dilakukan dengan membuat larutan standar asam klorogenat dalam metanol dengan 8 tingkat konsentrasi dibawah konsentrasi linieritas. Preparasi dan penotolan larutan standar, preparasi eluen, penjenuhan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada subbab linieritas. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis* (Indrayanto & Yuwono, 2003).

3.9.3 Selektivitas/Spesifisitas

Larutan standar dibuat dengan konsentrasi yang didapatkan dari hasil optimasi konsentrasi uji. Kemudian membuat larutan sampel dengan konsentrasi sesuai hasil optimasi konsentrasi uji. Preparasi dan penotolan larutan standar, preparasi eluen, penjenuhan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti

yang telah dijelaskan pada subbab linieritas. Selanjutnya kromatogram asam klorogenat yang terbentuk diamati dan dicek spektra *purity* dan *identity* puncak standar dan sampelnya. Pada kromatogram sampel, dihitung Resolusi puncak asam klorogenat terhadap puncak yang lain (*unknown*). Syaratnya yaitu nilai $R_s > 1,5$ (Harmita, 2004).

3.9.4 Presisi

Parameter presisi yang dilakukan meliputi *repeatability* dan *intermediet precision*. Uji presisi dilakukan dalam beberapa tahap yaitu pembuatan kurva baku pada 6 tingkat konsentrasi antara 80%-180% dari konsentrasi uji hasil optimasi. Kemudian dilakukan preparasi sampel untuk *repeatability* dengan menimbang sejumlah sampel ekstrak daun kopi robusta (6x replikasi) dan dilarutkan dalam metanol. Preparasi dan penotolan larutan standar, preparasi eluen, penjujukan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada subbab linieritas. Prosedur diatas dilakukan sebanyak tiga kali pada tiga hari yang berbeda untuk menentukan *intermediet precision* (presisi antara). Setelah itu, dihitung nilai parameter presisi dari data hasil scanning dengan program *Validation Method of Analysis* dan dilakukan perhitungan nilai SD dan RSD dimana nilai RSD tidak boleh lebih dari kriteria penerimaan studi kepresisian pada konsentrasi yang digunakan (AOAC, 1998).

3.9.5 Akurasi

Pengujian parameter akurasi pada penelitian ini menggunakan metode standar adisi. Pengujian akurasi dilakukan dengan dua tahap yaitu pembuatan sampel adisi dengan penambahan standar sebanyak 30%, 45% dan 60% dari konsentrasi analit dalam sampel sesuai dengan hasil uji presisi dan pembuatan kurva baku dengan rentang sesuai dengan konsentrasi linieritas. Pembuatan sampel akurasi dilakukan dengan menimbang sejumlah tertentu sampel, dimasukkan ke dalam labu ukur,

kemudian dilarutkan dengan metanol (tidak sampai tanda batas). Selanjutnya dilakukan adisi dengan larutan standar dengan konsentrasi 30%, 45% dan 60% dari konsentrasi analit yang terkandung dalam sejumlah sampel yang ditimbang. Kemudian ditambahkan metanol sampai tanda dan kocok sampai homogen. Masing-masing sampel adisi dibuat sebanyak 3 replikasi. Preparasi dan penotolan larutan standar, preparasi eluen, penjenuhan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada subbab linieritas. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai parameter akurasi dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis*. Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai presisi RSD dan berada pada rentang yang sesuai dengan konsentrasi yang digunakan (AOAC, 1998).

3.10 Penetapan Kadar Asam Klorogenat dalam Ekstrak Daun Kopi Robusta Tua dan Muda

Penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta tua dan muda diawali dengan pembuatan kurva baku dengan rentang sesuai dengan linieritas. Selanjutnya larutan sampel dipreparasi dengan menimbang sejumlah tertentu sampel ekstrak daun kopi robusta tua dan muda (replikasi 3 kali) kemudian dilarutkan dalam metanol. Selanjutnya larutan standar dan sampel dimasukkan dalam vial dan ditotolkan dalam lempeng KLT Silika Gel 60 F₂₅₄ untuk dianalisis dengan kondisi analisis (komposisi eluen, panjang gelombang, dan konsentrasi uji) sesuai dengan hasil optimasi. Noda yang terbentuk di *scanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Kemudian dilakukan perhitungan kadar % b/b.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan pengembangan dan validasi metode KLT Densitometri untuk penetapan kadar asam klorogenat pada ekstrak daun kopi robusta. Tahap pertama yang dilakukan adalah pengumpulan sampel daun kopi robusta untuk selanjutnya diekstraksi sehingga didapatkan ekstrak daun kopi robusta. Kemudian dilakukan optimasi kondisi analisis dan dilanjutkan dengan validasi metode analisis penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta. Tahapan terakhir yang dilakukan adalah penetapan kadar asam klorogenat pada ekstrak daun kopi robusta tua dan muda dengan menggunakan metode analisis yang telah diuji validitasnya.

4.1 Optimasi Kondisi Analisis

Optimasi kondisi analisis merupakan suatu optimasi yang dilakukan untuk mendapatkan pemisahan yang baik pada metode kromatografi. Setelah dilakukan optimasi diharapkan akan didapatkan kondisi analisis yang optimum. Pemilihan kondisi analisis yang optimum dilihat berdasarkan penilaian parameter efisiensi sistem kromatografi, antara lain: nilai R_s , nilai N , dan H (Wulandari, 2011). Optimasi kondisi analisis yang dilakukan dalam penelitian ini adalah optimasi eluen, optimasi panjang gelombang dan optimasi konsentrasi uji.

4.1.1 Optimasi Eluen

Optimasi eluen dilakukan untuk mendapatkan kromatogram yang efisien. Kromatogram yang efisien dapat dilihat dari nilai efisiensi kromatogram yang terdiri dari nilai N yang paling besar, nilai H yang terkecil, nilai R_f antara 0,2-0,8 (Wulandari, 2011) dan menghasilkan kromatogram dengan satu puncak yang

simetris. Pada penelitian ini, eluen yang digunakan didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Urakova *et al.* (2008) dan kemudian dilakukan modifikasi untuk mendapatkan eluen yang optimum. Hasil optimasi ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Perbandingan parameter efisiensi kromatogram pada komposisi eluen yang berbeda

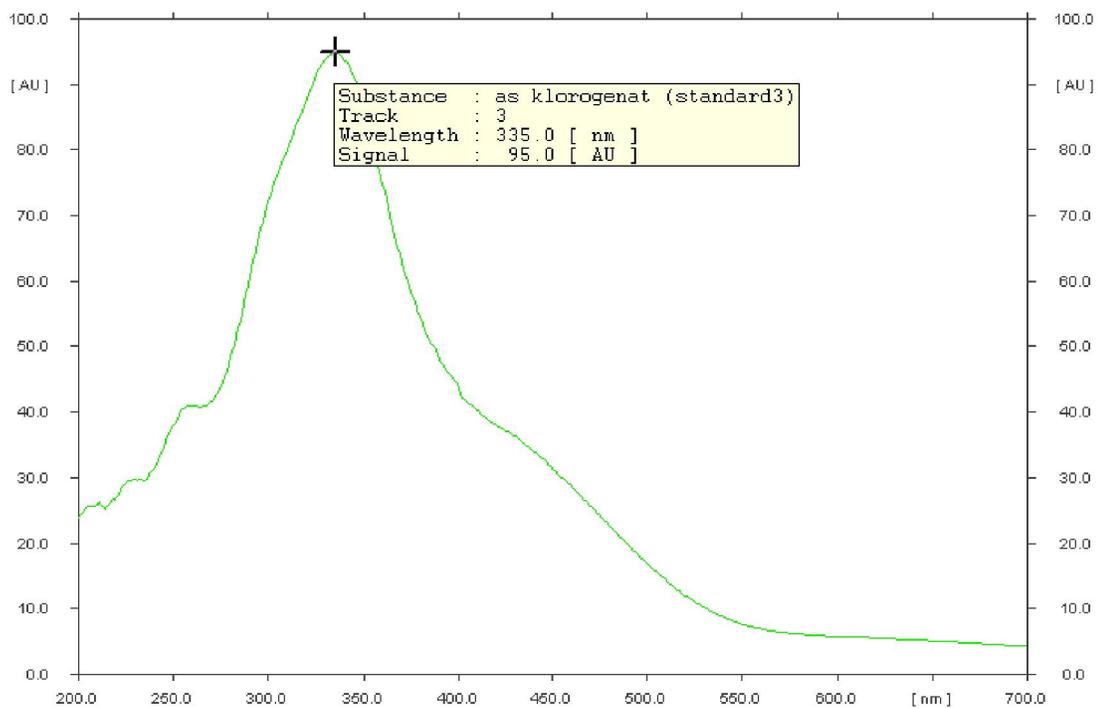
No	Komposisi Eluen	Parameter Penilaian		
		<i>Rf</i>	N	H
1	EA:DM:AF:AA:Aq (v/v/v/v/v) = 100:25:10:10:11	0,31	153,76	0,59
2	AF:EA:Aq (v/v/v) = 1:8:1	0,78	804,50	0,11
3	AF:EA:Aq (v/v/v) = 1:8:1,5	0,54	324,00	0,28

EA : Etil Asetat
 DM : Dikloromethan
 AF : Asam Format
 AA : Asam Asetat
 Aq : Aquabidest

Berdasarkan hasil optimasi eluen, komposisi eluen yang dipilih adalah eluen dengan komposisi asam format : etil asetat : aquabidest (v/v/v) = 1:8:1,5 yang menghasilkan nilai N sebesar 324,00 ; nilai H sebesar 0,28; nilai *Rf* 0,54 (masuk rentang 0,2-0,8) dan menghasilkan kromatogram dengan satu puncak yang simetris. Berdasarkan data pada Tabel 4.1, eluen dengan komposisi asam format : etil asetat : aquabidest (v/v/v) = 1:8:1 menghasilkan N paling besar yaitu 804,50; nilai H paling kecil yaitu 0,11 dan nilai *Rf* sebesar 0,78 (masuk rentang 0,2 - 0,8). Namun komposisi eluen ini tidak dipilih karena menghasilkan kromatogram yang tidak simetris seperti ditunjukkan pada lampiran A.2 dan mempunyai *Rf* yang terlalu tinggi. Perhitungan efisiensi kromatogram dan gambar kromatogram masing-masing eluen dapat dilihat pada lampiran A.

4.1.2 Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan menotolkan standar asam klorogenat yang dilarutkan dalam metanol p.a pada lempeng KLT kemudian dievaluasi dengan asam format : etil asetat : aquabides (v/v/v) = 1:8:1,5. Noda yang dihasilkan *discanning* pada panjang gelombang 200-700 nm. Panjang gelombang yang dipilih adalah panjang gelombang yang memberikan intensitas spektrum paling tinggi. Hasil *scanning* spektra standar asam klorogenat dapat dilihat pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Spektra standar asam klorogenat pada panjang gelombang 200-700 nm

Berdasarkan spektra yang didapatkan dari hasil *scanning*, dapat diketahui intensitas spektrum paling tinggi terjadi pada saat panjang gelombang asam klorogenat 335 nm, sehingga panjang gelombang terpilih dan yang digunakan dalam pengukuran selanjutnya adalah 335 nm.

4.1.3 Optimasi Konsentrasi Uji

Optimasi konsentrasi uji dilakukan dengan memilih konsentrasi yang memberikan nilai N paling besar, nilai H paling kecil dan kemudahan dalam preparasi sampel. Kemudahan preparasi sampel ini dilihat dari jumlah sampel dan pelarut yang digunakan. Data hasil optimasi konsentrasi uji dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Perbandingan nilai parameter efisiensi kromatogram pada konsentrasi analit yang berbeda

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	N	H
50	100	529,00	0,17
75	150	417,98	0,21
100	200	292,10	0,31
150	300	353,44	0,25

Berdasarkan data efisiensi kromatogram yang ditampilkan pada Tabel 4.2, konsentrasi uji yang memenuhi parameter efisiensi kromatogram adalah konsentrasi uji 50 ppm. Serta pada konsentrasi ini, preparasi sampel lebih mudah dilakukan.

Dari keseluruhan optimasi yang dilakukan, didapatkan kondisi analisis yang paling optimum untuk analisis asam klorogenat yang dapat dilihat pada Tabel 4.3 berikut.

Tabel 4.3 Kondisi optimum analisis asam klorogenat dengan KLT Densitometri

No	Kondisi Analisis	Kondisi Optimum
1	Pelarut	Metanol p.a
2	Fase diam	Silika Gel 60 F ₂₅₄
3	Eluen	Asam format : etil asetat : aquabides (v/v/v) = 1:8:1,5
4	Panjang gelombang	335 nm
5	Konsentrasi uji	50 ppm
6	Metode pengembangan	Menaik

4.2 Validasi Metode Analisis

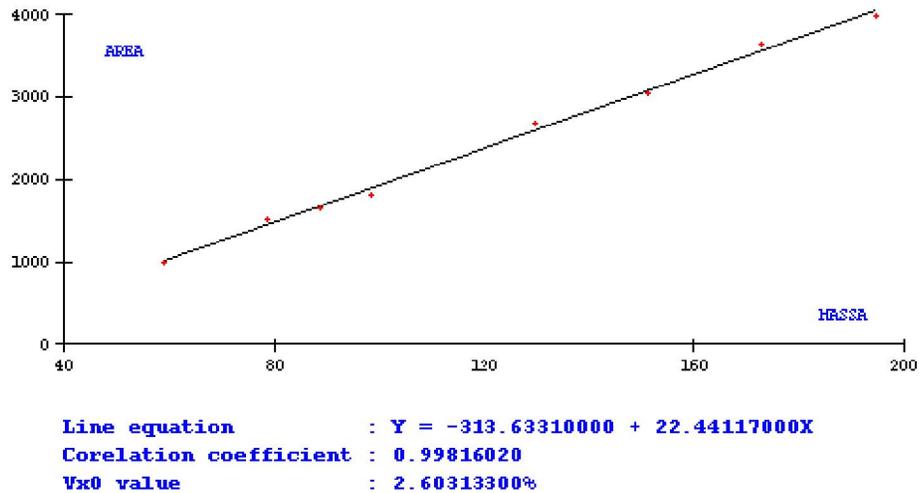
Pada penelitian ini dilakukan validasi metode analisis yang meliputi pengujian parameter linieritas, batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK), selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi.

4.2.1 Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita, 2004). Menurut Indrayanto & Yuwono (2003), untuk pengujian linieritas direkomendasikan menggunakan 5-10 konsentrasi standar dengan rentang 80-120%, 25-200% atau 50-150% dari kadar analit yang diperkirakan. Pada penelitian ini, pengujian linieritas dilakukan dengan menggunakan 8 konsentrasi standar dengan rentang 25-200%. Larutan standar diekspansi dan *discanning* sehingga dihasilkan data area standar asam klorogenat. Data yang diperoleh dari hasil *scanning* densitometer dihitung menggunakan software *Validation Method of Analysis*. Kriteria penerimaan suatu metode dikatakan linier jika koefisien korelasi (r) $\geq 0,99$; Koefisien variasi fungsi (V_{xo}) $< 5\%$ serta nilai X_p lebih kecil dari konsentrasi terkecil yang digunakan. Hasil uji linieritas ditunjukkan pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.2 berikut.

Tabel 4.4 Hasil uji linieritas asam klorogenat

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
29,51	59,02	990,27
39,34	78,69	1520,21
44,26	88,52	1651,60
49,18	98,36	1808,27
64,86	129,72	2681,53
75,67	151,34	3044,38
86,48	172,96	3641,18
97,29	194,58	3993,02
Persamaan regresi linier	$Y = -313,6331 + 22,44117X$ $r = 0,998$ $V_{xo} = 2,60\%$ $X_p = 16,99 \text{ ng}$	



Gambar 4.2 Kurva linieritas massa vs area asam klorogenat

Berdasarkan Tabel 4.4 dan Gambar 4.2 dapat diketahui bahwa hasil uji linieritas asam klorogenat menunjukkan hubungan yang proporsional antara massa dan area yang ditunjukkan dengan persamaan regresi dengan nilai $r=0,998$; $Vxo=2,60\%$ dan $Xp=16,99$ ng. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi persyaratan linieritas yaitu dengan nilai $r \geq 0,99$; $Vxo < 5\%$ dan $Xp < 59,02$ ng.

4.2.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

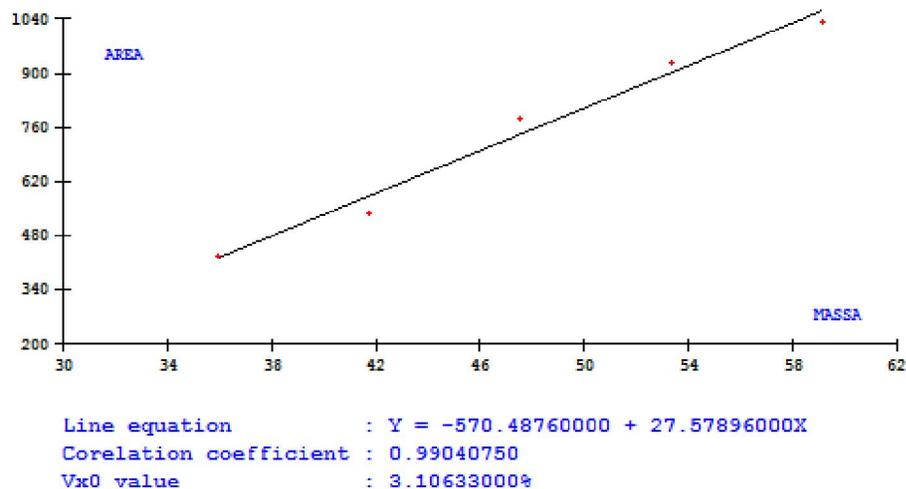
Menurut Harmita (2004), batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Pada

pengujian BD dan BK penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi standar dibawah konsentrasi linieritas. Pada pengujian ini, nilai parameter linieritas seperti r , V_{x0} dan X_p harus terpenuhi terlebih dahulu melalui software *Validation Method of Analysis*, kemudian nilai BD dan BK dapat ditentukan menggunakan software yang sama. Hasil uji BD dan BK dapat dilihat pada Tabel 4.5 dan Gambar 4.3 berikut ini.

Tabel 4.5 Hasil uji BD dan BK asam klorogenat

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
17,98	35,96	427,56
20,88	41,76	537,45
23,78	47,56	782,10
26,68	53,36	925,31
29,58	59,16	1033,42

Persamaan regresi linier $Y = -570,4876 + 27,57896X$
 $r = 0,990$
 $V_{x0} = 3,11\%$
 $X_p = 16,22 \text{ ng}$



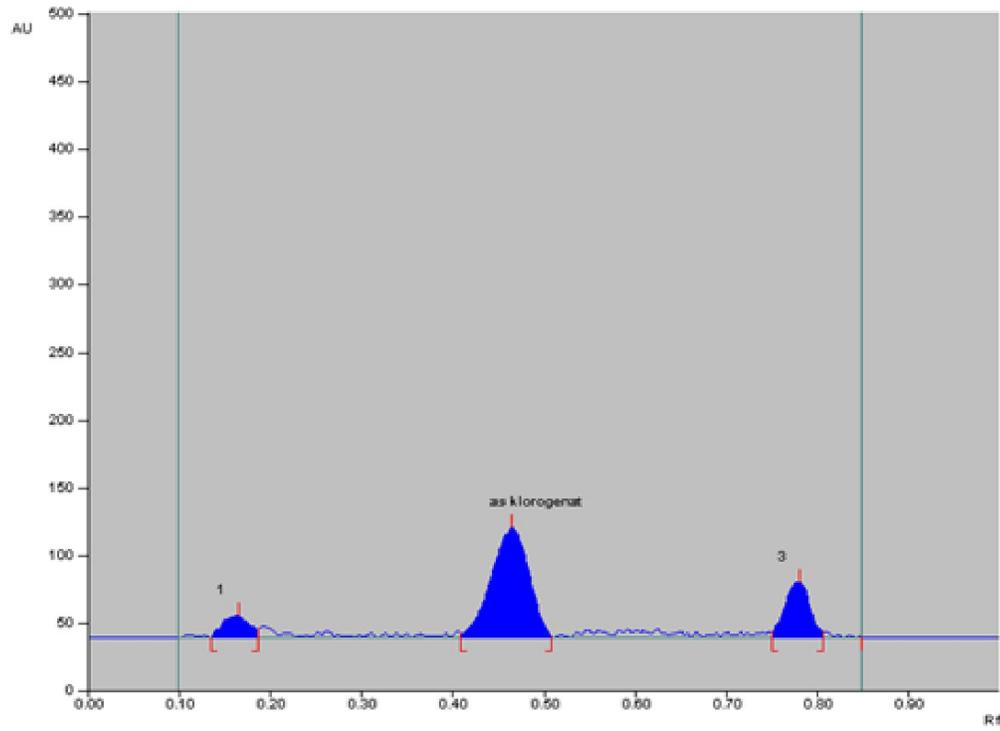
Gambar 4.3 Kurva linieritas massa vs area asam klorogenat pada uji BD dan BK

Berdasarkan Tabel 4.5 dan Gambar 4.3 di atas dapat diketahui bahwa parameter linieritas terpenuhi pada rentang konsentrasi 17,98-29,58 ppm. Nilai BD sama dengan nilai X_p yaitu 16,22 ng dan BK adalah 48,66 ng. Data perhitungan dapat dilihat pada lampiran E.

4.2.3 Selektivitas/Spesifisitas

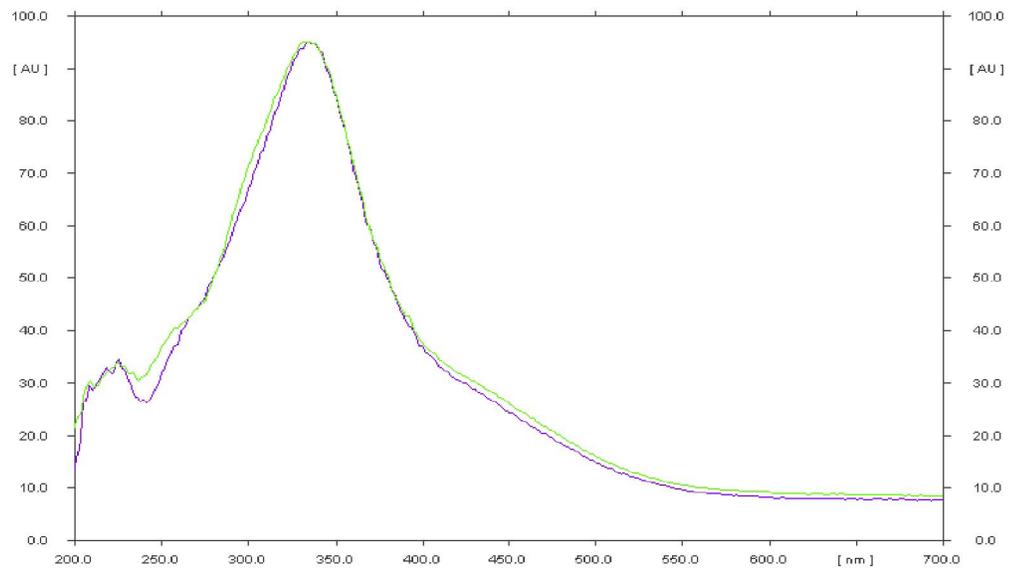
Menurut Harmita (2004), selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s) dimana nilai R_s sebaiknya lebih dari 1,5. Sedangkan parameter untuk mengetahui spesifisitas metode dapat ditentukan berdasarkan pengamatan kemurnian (*purity*) dan identitas (*identity*) analit dalam sampel.

Pada uji selektivitas, nilai R_s didapatkan dari menghitung nilai R_s puncak asam klorogenat terhadap puncak yang lain (*unknown*) pada kromatogram sampel. Pada kromatogram sampel terdapat 2 puncak *unknown* yang dekat dengan puncak asam klorogenat. Pemisahan puncak asam klorogenat terhadap puncak *unknown* dapat dilihat pada Gambar 4.4. Dari perhitungan didapatkan nilai R_s puncak asam klorogenat dengan puncak *unknown* 1 sebesar 4,00 dan nilai R_s puncak asam klorogenat dengan puncak *unknown* 3 sebesar 3,86 (Perhitungan R_s dapat dilihat pada Lampiran F). Hasil ini menunjukkan pemisahan yang baik antara puncak asam klorogenat terhadap puncak yang lain (*unknown*). Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan selektif.

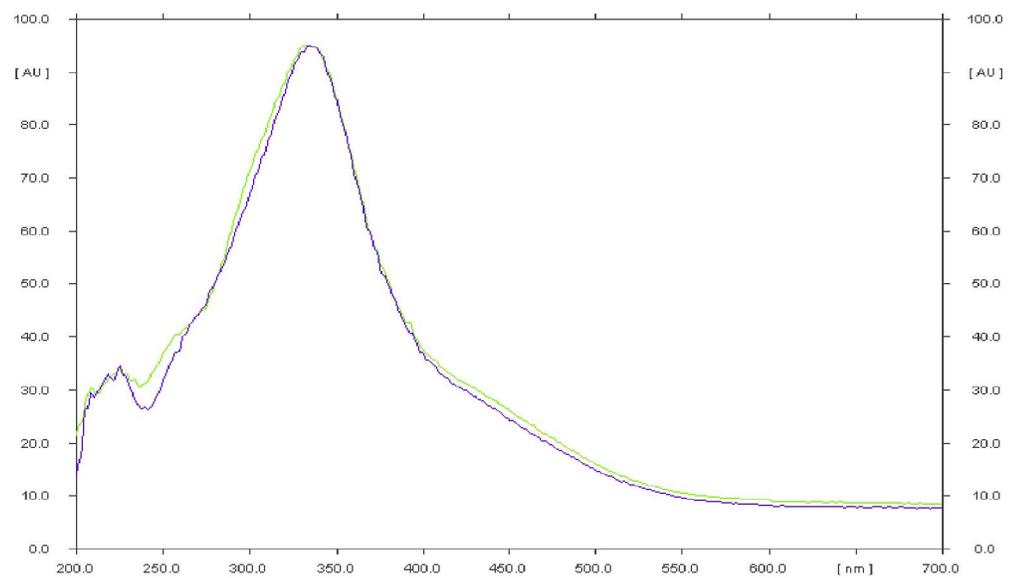


Gambar 4.4 Kromatogram pemisahan pada ekstrak daun kopi robusta tua

Pada uji spesifisitas dilakukan dengan penilaian terhadap kemurnian (*purity*) dan identitas (*identity*) analit dalam sampel yang dapat dilihat pada Gambar 4.5 dan data mengenai korelasi spektra pada uji kemurnian dan identitas dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan Tabel 4.7 berikut.



(a) Spektra uji kemurnian asam klorogenat dalam standar dan sampel



(b) Spektra uji identitas asam klorogenat dalam standar dan sampel



= Spektra standar asam klorogenat



= Spektra asam klorogenat dalam sampel

Gambar 4.5 Spektra kemurnian dan identitas asam klorogenat

Tabel 4.6 Hasil uji kemurnian asam klorogenat

Uji	Track	Rf	r(s,m)	r(m,e)	Purity
Kemurnian	Standar	0,52	0,999726	0,999190	OK
	Sampel	0,53	0,999743	0,999592	OK

Tabel 4.7 Hasil uji identitas asam klorogenat

Uji	Track	Rf	r(s,s)	r(s,a)	Identity
Identitas	Standar	0,52	0,995147	0,997316	OK
	Sampel	0,53	0,995147	0,999906	OK

Kemurnian asam klorogenat dalam sampel dilihat berdasarkan nilai $r(s,m)$ dan $r(m,e)$. Nilai $r(s,m)$ menunjukkan korelasi antara spektra yang diambil pada posisi awal/*start* (s) puncak dengan spektra pada puncak/*maximum* (m) *peak*. Sedangkan nilai $r(m,e)$ menunjukkan korelasi antara spektra yang diambil pada posisi puncak *peak* dengan spektra pada posisi akhir/*end* (e) puncak. Suatu analit dikatakan murni jika nilai $r(s,m)$ dan nilai $r(m,e)$ pada uji menghasilkan nilai lebih dari 0,99. Dari Tabel 4.6 dapat diketahui nilai korelasi spektra asam klorogenat pada standar dan sampel lebih dari 0,99. Ini menunjukkan bahwa analit dalam standar dan sampel adalah murni. Pada uji identitas ditentukan dengan cara membandingkan nilai $r(s,s)$ dengan nilai $r(s,a)$. Nilai $r(s,s)$ menunjukkan korelasi spektra antara dua *track* standar, sedangkan $r(s,a)$ menunjukkan korelasi antara *track* standard dan *track* analit dalam sampel. Analit dalam sampel dikatakan identik dengan standar jika nilai korelasinya lebih dari 0,99. Dari Tabel 4.7 dapat dilihat bahwa nilai korelasi spektra yang didapatkan pada penelitian ini lebih dari 0,99. Sehingga analit dalam sampel identik dengan standar asam klorogenat. Berdasarkan penilaian parameter selektivitas dan spesifisitas yang telah dijabarkan di atas, dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan bersifat selektif dan spesifik.

4.2.4 Presisi

Presisi atau keseksamaan 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 (Harmita, 2004). Pada penentuan presisi dapat dilakukan pada 3 kategori yaitu repeatibilitas, presisi antara dan reproduibilitas. Dari ketiga kategori di atas, yang wajib dilakukan adalah repeatibilitas dan presisi antara (Indrayanto & Yuwono, 2003). Sehingga pada penelitian ini hanya dilakukan uji presisi repeatibilitas dan presisi antara. Untuk uji presisi repeatibilitas dilakukan dengan pengukuran sampel sebanyak 6 replikasi pada 100% konsentrasi uji. Dari data yang diperoleh kemudian dihitung nilai RSD-nya. Sedangkan untuk uji presisi antara dilakukan dengan melakukan prosedur yang sama seperti pada uji presisi repeatibilitas namun percobaan dilakukan pada tiga hari yang berbeda. Kemudian dilakukan perhitungan nilai RSD dari data yang diperoleh pada satu hari pengujian dan rata-rata RSD pada tiga hari pengujian. Syarat penerimaan uji presisi adalah nilai RSD tidak boleh lebih dari kriteria penerimaan studi kepresisian pada konsentrasi yang digunakan yang dapat dilihat pada tabel konsentrasi analit berbanding %RSD oleh AOAC (1998). Data hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.8 dan Tabel 4.9 berikut ini.

Tabel 4.8 Hasil uji presisi repeatibilitas asam klorogenat

Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	RSD (%)
80,3	1,16	1,45	0,99
80,6	1,18	1,46	
81,0	1,20	1,49	
81,0	1,20	1,48	
80,6	1,19	1,47	
80,5	1,17	1,45	
	Rata-rata	1,47	

Tabel 4.9 Hasil uji presisi antara asam klorogenat

Hari ke-	Kadar b/b (%)	RSD (n=6)
1	1,47	0,99 %
2	1,46	2,15 %
3	1,44	2,12 %
Rata-rata RSD		1,75 %

Berdasarkan Tabel 4.8 dan Tabel 4.9, dapat diketahui bahwa kadar asam klorogenat pada sampel adalah lebih dari 1%, sehingga kriteria penerimaan untuk uji presisi yaitu RSD harus kurang dari 2,7%. Dari hasil penelitian didapatkan nilai RSD pada uji presisi repeatabilitas adalah 0,99% dan pada uji presisi antara adalah 1,75%. Berdasarkan hasil tersebut nilai RSD yang didapatkan telah memenuhi kriteria penerimaan uji presisi. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan dapat memberikan hasil yang presis.

4.2.5 Akurasi

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Akurasi dapat dilakukan dengan dua metode yaitu metode simulasi dan penambahan standar. Pada penelitian ini digunakan metode penambahan standar (standar adisi) karena metode simulasi memerlukan pembuatan plasebo. Sedangkan pembuatan plasebo (daun kopi tanpa asam klorogenat) sebagai matriks tidak bisa dilakukan.

Uji akurasi dengan metode penambahan standar dilakukan dengan menghitung % *recovery* yang dihasilkan dari penambahan standar sebanyak 30%, 45% dan 60% dari kadar analit dalam sampel yang didapat dari hasil uji presisi (Indrayanto & Yuwono, 2003). Data perhitungan akurasi dapat dilihat pada Lampiran H dan hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.10.

Tabel 4.10 Hasil uji akurasi asam klorogenat

Adisi	Penimbangan Sampel (mg)	Penambahan Standar Adisi (mg)	Massa Teoritis (ng)	Massa Hasil Percobaan (ng)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	RSD (%)
30%	80,4	0,35	122,55	126,63	103,33	102,12	1,97
	80,2	0,35	122,32	126,26	103,23		
	80,5	0,35	122,67	122,42	99,80		
45%	80,3	0,52	136,03	133,03	97,79	98,28	1,16
	80,2	0,52	135,92	132,46	97,46		
	80,1	0,52	135,80	135,23	99,58		
60%	80,7	0,68	149,30	150,16	100,57	98,75	1,61
	80,0	0,68	148,48	145,01	97,66		
	80,0	0,68	148,48	145,54	98,02		
Rata-rata						99,72	1,58

Kriteria penerimaan untuk uji akurasi dengan kadar analit lebih dari 1% adalah *mean recovery* yang diperoleh berada pada rentang 97%-103% dengan RSD kurang dari 2,7% (AOAC, 1998). Berdasarkan tabel 4.10, *mean recovery* yang diperoleh dari penelitian ini adalah 99,72% dengan RSD 1,58%. Hasil yang diperoleh telah memenuhi kriteria penerimaan uji akurasi yang digunakan. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan dapat menghasilkan hasil yang akurat.

Berdasarkan hasil pengujian parameter validasi yang telah dilakukan yaitu linieritas, BD & BK, selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi, diketahui bahwa metode analisis asam klorogenat dengan KLT Densitometri menghasilkan hasil analisis yang valid.

4.3 Penetapan Kadar Asam Klorogenat pada Ekstrak Daun Kopi Robusta Tua dan Muda

Tahap terakhir dalam penelitian ini setelah metode analisis yang digunakan dinyatakan valid adalah melakukan penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta tua dan muda. Hasil penetapan kadar asam klorogenat pada daun kopi robusta tua dan muda masing-masing dapat dilihat pada Tabel 4.11 dan Tabel 4.12 berikut.

Tabel 4.11 Kadar asam klorogenat pada ekstrak daun kopi robusta tua

Replikasi	Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	RSD (%)
1	80,3	1,16	1,45	0,74
2	80,6	1,18	1,46	
3	80,6	1,19	1,47	
Rata-rata			1,46	

Tabel 4.12 Kadar asam klorogenat pada ekstrak daun kopi robusta muda

Replikasi	Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	RSD (%)
1	80,4	0,83	1,03	1,29
2	80,8	0,85	1,05	
3	80,4	0,83	1,03	
Rata-rata			1,04	

Berdasarkan Tabel 4.11 dan Tabel 4.12, dapat diketahui bahwa kadar rata-rata asam klorogenat pada ekstrak daun kopi robusta tua adalah 1,46%b/b dengan RSD 0,74% sedangkan kadar rata-rata asam klorogenat pada ekstrak daun kopi robusta muda adalah 1,04 %b/b dengan RSD 1,29%. RSD yang dihasilkan pada penetapan kadar pada kedua sampel ini telah memenuhi persyaratan yaitu kurang dari 2,7% AOAC (1998).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini, dapat ditulis beberapa kesimpulan sebagai berikut.

- 5.1.1 Kondisi optimum metode untuk penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta dengan metode KLT Densitometri yaitu digunakan pelarut metanol p.a; fase diam silika gel 60 F₂₅₄; eluen asam format : etil asetat : aquabidest (v/v/v) = 1:8:1,5 ; panjang gelombang 335 nm; konsentrasi uji 50 ppm dan metode pengembangan menaik.
- 5.1.2 Metode analisis penetapan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta dengan metode KLT Densitometri dapat memberikan hasil analisis sebagai berikut.
 - a. Linier dengan koefisien korelasi (r) = 0,998; nilai V_{xo} = 2,60% dan nilai X_p = 16,99 ng
 - b. Peka dengan nilai BD = 16,22 ng dan BK= 48,66 ng
 - c. Selektif karena mampu memisahkan senyawa asam klorogenat dengan senyawa lain yang ada dalam sampel dengan nilai R_s lebih dari 1,5 dan spesifik dengan nilai korelasi spektra pada uji kemurnian dan uji identitas lebih dari 0,99.
 - d. Presisi dengan RSD uji presisi repeatabilitas = 0,99% dan RSD uji presisi antara = 1,75%
 - e. Akurat dengan $mean\ recovery \pm RSD = 99,72\% \pm 1,58\%$
- 5.1.3 Kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta tua \pm RSD sebesar 1,46% \pm 0,74% dan kadar asam klorogenat dalam ekstrak daun kopi robusta muda \pm RSD sebesar 1,04 % \pm 1,29%.

5.2 Saran

Perlu dilakukan pengembangan metode validasi yang lain seperti ketangguhan metode (*ruggedness*), kekuatan (*robustness*) maupun uji SST (*System Suitability Test*) agar metode ini dapat dilakukan kapanpun, dimanapun dan oleh siapapun.

DAFTAR PUSTAKA

- AAK.1988. *Budidaya Tanaman Kopi*. Yogyakarta : Penerbit Kanisius
- AOAC. 1998. *Peer-Verified Methods Program Manual on Policies and Procedures*. USA : Arlington, Virginia
- Belay, G. & Gholap, A.P. 2009. Characterization and Determination of Chlorogenic Acids (CGA) in Coffee Beans by UV-Vis Spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. **3** (11) : 234-240.
- Choiron, M. 2010. Penerapan GMP pada Penanganan Pasca Panen Kopi Rakyat untuk Menurunkan Okratoksin Produk Kopi (Studi Kasus di Sidomulyo, Jember). *Agrointek*. **4** (2) : 114-120
- Clifford, M.N. 1999. Review: Chlorogenic Acids and Other Cinnamates Nature, Occurrence and Dietary Burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **79** : 362-372.
- Deinstrop, E.H. 2007. *Applied Thin-Layer Chromatography : Best Practice and Avoidance of Mistakes Second, Revised and Enlarged Edition*. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Depkes R.I. 2009. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Farah, A. 2012. *Coffee constituents in Coffee: Emerging Health Effects and Disease revention*. First Edition. United Kingdom : Blackwell Publishing Ltd.
- Farah, A., Paulis, T.D., Trugo, L.C. & Martin, P.R. 2005. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53** :1505–1513.
- Gocan, S. 2002. Stationary Phases for Thin-Layer Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. **40** : 1-12
- Harborne, J.B., Baxter, H. & Moss, G.P. 1999. *Phytochemical Dictionary : A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. London : Taylor & Francis Ltd.

- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. **1** (3) : 117 – 135.
- ICH (*International Conference On Harmonisation*). 1994. *Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1)*. European Union, Japan,USA : ICH Expert Working Group.
- Indrayanto, G. dan Yuwono, M. 2003. *Validation of TLC Analyses in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Indonesia.
- ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*). 2011. *Coffea L.* www.itis.gov[serial online]. http://itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=35189. [29 November 2014].
- Kowalska, T. & Prus, W. 2003. *Optimization of Thin-Layer Chromatography in Encyclopedia of Chromatography*. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Kristianta, F.X., Utomo, S.B. & Irawan, J.F. 2013. “ IbM Petani Kopi Desa Pace Kecamatan Silo Kabupaten Jember”. Tidak Diterbitkan. Laporan Akhir Ipteks Bagi Masyarakat (I_bM). Jember : Lembaga Pengabdian Masyarakat Universitas Jember.
- Lee, J.H., Park, J.H., Kim, Y.S., & Han, Y. 2008. Chlorogenic Acid, a Polyphenolic Compound, Treats Mice with Septic Arthritis Caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology*. **8** : 1681–1685.
- Leonardis, D.A., Pizzella, L. & Macciola, V. 2008. Evaluation of Chlorogenic Acid and Its Metabolites as Potential Antioxidants for Fish Oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **110** (10) : 941-948
- Maria, C.A.B.D., Trugo, L.C. & Moreira, R.F.A. 1994. Simultaneous Determination of Total chlorogenic Acid, Trigonelline and Caffeine in Green Coffee Samples by High Performance Gel Filtration Chromatography. *Food Chemistry*. **52** : 447-449.
- Maridelana, V.P., Hariyati, Y. & Kuntadi, E.B. 2014. Fungsi keuntungan usaha tani kopi rakyat di desa Belantih kecamatan Kintamani kabupaten Bangli. *Berkala Ilmiah Pertanian*. **1** (3) : 47-52.
- Martyanti, E. N. 2010. “Validasi Metode Analisis dan Penetapan Kadar Cetirizine Dihidroklorida dalam Tablet Secara KLT Densitometri”. Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Universitas Jember.

- McPolin, O. 2009. *Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis*. United Kingdom : Mourn Training Service.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J. & Hu, Y. 2013. Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism : A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2013** : 1-11
- Munson, J.W. 1991. *Analisis Farmasi Metode Modern*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Mutua, J. 2000. Post Harvest Handling and Processing of Coffee in African Countries. [www.fao.org. http://www.fao.org/docrep/003/x6939e/X6939e00.htm](http://www.fao.org/docrep/003/x6939e/X6939e00.htm). [3 Maret 2015].
- Najayati, S. & Danarti.2012. *Kopi, Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta : PT. Penebar Swadaya
- Olthof, M.R., Hollman, P.C.H. & Katan, M.B. 2001. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *Journal of Nutrition*. **131**: 66–71.
- Prastowo, B., Karmawati, E., Rubijo, Siswanto, Indrawanto, C. & Munarso, S.J. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Bogor : Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat Edisi Pertama*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Salgado, P.R., Favarin, J.L., Leandro, R.A. & Filho, O.F,L. 2008. Total Phenol Concentrations in Coffee Tree Leaves during Fruit Development. *Scientia and Agricola*. **65** (4) : 354-359.
- Sherma, J & Fried, B. 2003. *Handbook of Thin Layer Chromatography 3rd Edition, Revised and Expanded*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Thom, E. 2007. The Effect of Chlorogenic Acid Enriched Coffee on Glucose Absorption in Healthy Volunteers and Its Effect on Body Mass When Used Long-term in Overweight and Obese People. *The Journal of International Medical Research*. **35** : 900-908
- Tice, R. 1998. *Chlorogenic Acid [327-97-9] and Caffeic Acid [331-39-5] : Review of Toxicological Literature*. North Carolina : ILS.

- Tongco, M.D.C. 2007. Purposive Sampling as a Tool for Informant Selection. *Ethnobotany Research & Applications*. **5** : 147-158.
- Urakova, I.N., Pozharitskaya, O.N., Shikov, A.N., Kosman, V.M. & Makarov, V.G. 2008. Comparison of High Performance TLC and HPLC for Separation and Quantification of Chlorogenic Acid in Green Coffee Bean Extracts. *Journal of Separation Science*. **31** : 237 – 241.
- Wall, P.E. 2005. *Thin-Layer Chromatography :A Modern Practical Approach*. United Kingdom : RSC.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Yashin, A., Yashin, Y., Wang, J.Y. & Nemzer, B. 2013. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Antioxidants*. **2** : 230-245.
- Zhao, Y., Wang, J., Balleve, O., Luo, H. & Zhang, W.2011. Antihypertensive Effects and Mechanisms of Chlorogenic Acids. *Hypertension Research*. **2011** : 1-5.

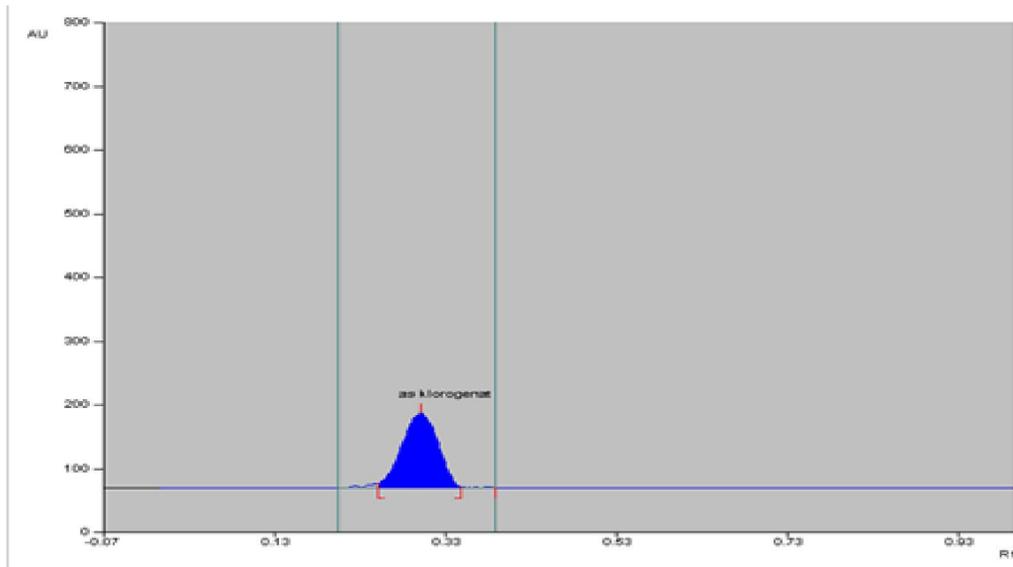
LAMPIRAN

A. Data Optimasi Eluen

No	Komposisi Eluen	Parameter Penilaian		
		<i>R_f</i>	N	H
1	EA:DM:AF:AA:Aq (v/v/v/v/v) = 100:25:10:10:11	0,31	153,76	0,59
2	AF:EA:Aq (v/v/v) = 1:8:1	0,78	804,50	0,11
3	AF:EA:Aq (v/v/v) = 1:8:1,5	0,54	324,00	0,28

EA	: Etil Asetat
DM	: Dikloromethan
AF	: Asam Format
AA	: Asam Asetat
Aq	: Aquabidest

A.1 Etil Asetat:Dikloromethan:Asam Format:Asam Asetat:Aquabidest (v/v/v/v/v)
 = 100:25:10:10:11

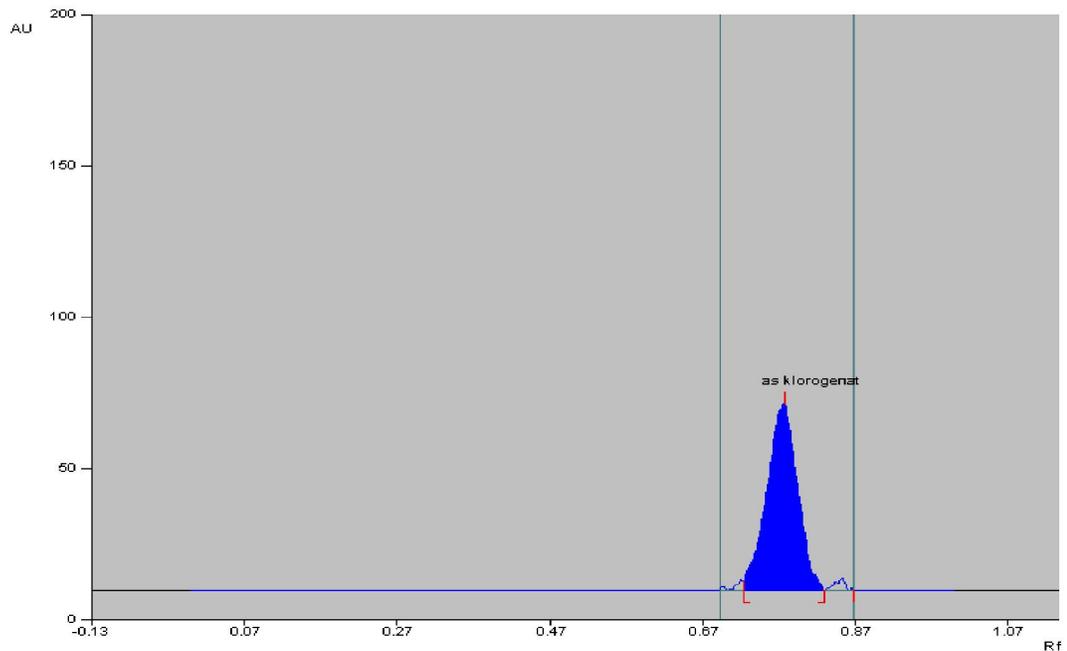


Peak	Start Position	Start Height	Max Postion	Max Height	Max%	End Position	End Height	Area	Area%	Assigned substance
1	0.25Rf	6,9AU	0,31Rf	117,0AU	100.00%	0,35Rf	1,6AU	4291,5 AU	100.0%	As. klorogenat

$$N = 16 \left(\frac{R_f}{w} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,31}{0,35-0,25} \right)^2 = 153,76$$

$$H = \frac{L}{N} = \frac{90}{153,76} = 0,59$$

A.2 Asam Format: Etil Asetat:Aquabidest (v/v/v) = 1:8:1

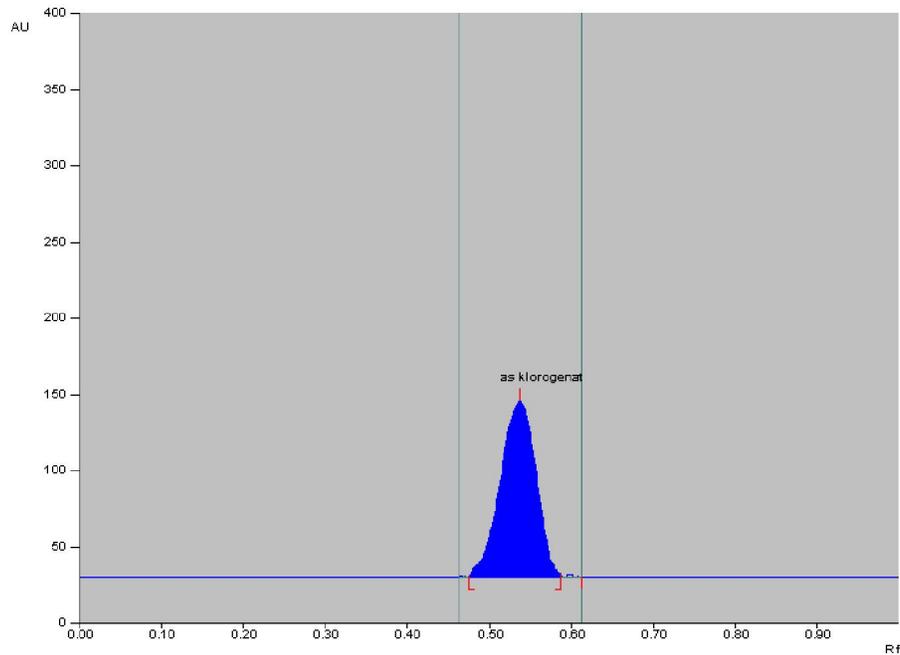


Peak	Start Position	Start Height	Max Postion	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.72 Rf	3.4AU	0.78 Rf	61.7AU	100.00%	0.83Rf	0.1AU	2041.1AU	100.00%	As. klorogenat

$$N = 16 \left(\frac{Rf}{w} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,78}{0,83-0,72} \right)^2 = 804,50$$

$$H = \frac{L}{N} = \frac{90}{804,50} = 0,11$$

A.3 Asam Format: Etil Asetat:Aquabidest (v/v/v) = 1:8:1,5



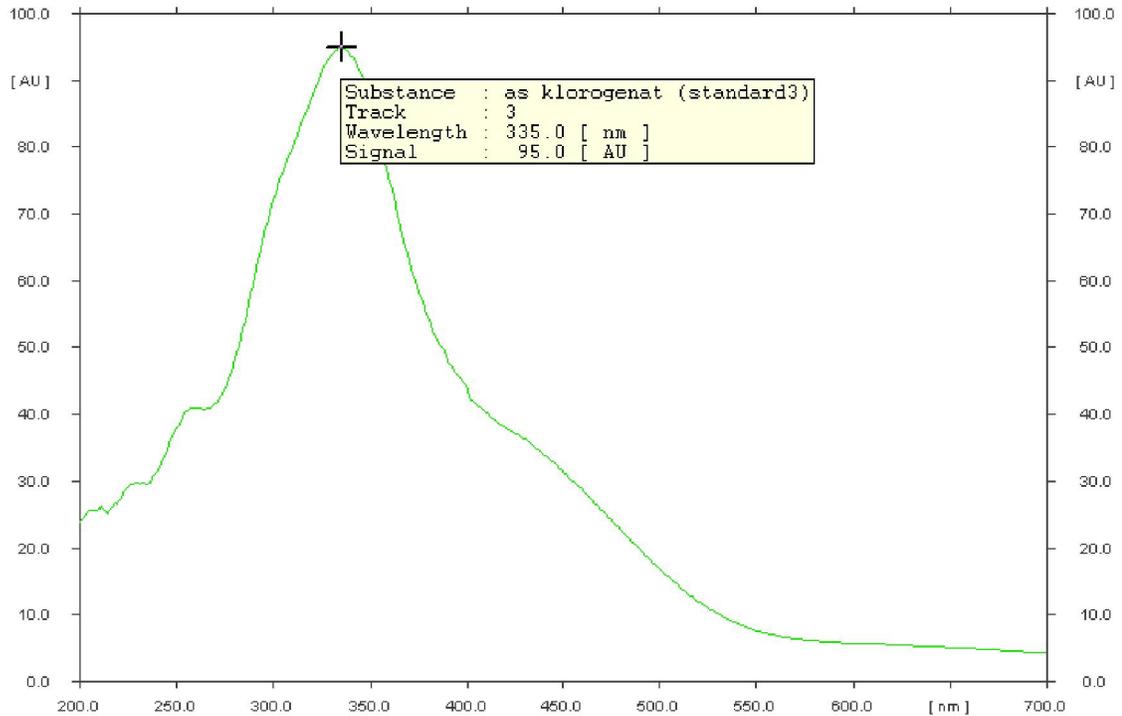
Peak	Start Position	Start Height	Max Postion	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.47 Rf	0.5AU	0.54 Rf	116.1AU	100.00%	0.59Rf	1.6AU	4681.4AU	100.00%	As. klorogenat

$$N = 16 \left(\frac{R_f}{w} \right)^2 = 16 \left(\frac{0,54}{0,59-0,47} \right)^2 = 324$$

$$H = \frac{L}{N} = \frac{90}{324} = 0,28$$

Eluen terpilih adalah asam format : etil asetat : aquabides (1:8:1,5)

B. Data Optimasi Panjang Gelombang



Panjang gelombang maksimum hasil optimasi adalah 335 nm.

C. Data Optimasi Konsentrasi Uji

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	N	H
50	100	529	0,17
75	150	417,98	0,21
100	200	292,10	0,31
150	300	353,44	0,25

D. Data Linieritas

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
29,51	59,02	990,27
39,34	78,69	1520,21
44,26	88,52	1651,60
49,18	98,36	1808,27
64,86	129,72	2681,53
75,67	151,34	3044,38
86,48	172,96	3641,18
97,29	194,58	3993,02
Persamaan regresi linier	$Y = -313,6331 + 22,44117X$ $r = 0,99816020$ $V_{xo} = 2,603133\%$ $X_p = 16,99066$	

Method : Linearity

Probability : 95%

Number of data : 8

Line equation : $Y = -313,6331 + 22,44117X$

Corelation coefficient : 0,99816020

Sy value : 71,06397000

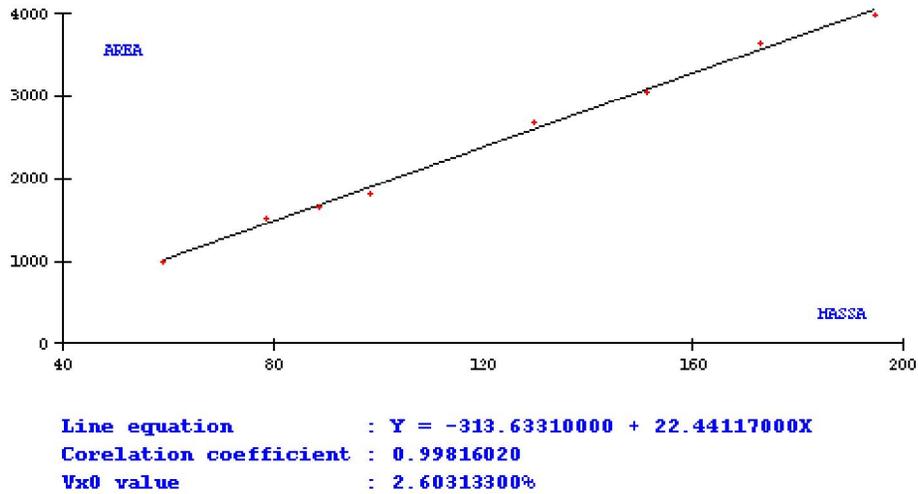
Vx0 value : 2,60313300%

Xp value : 16,99066000

The Corelation coefficient is fulfilled the requirement (> 0,99)

The Vx0 value is fulfilled the requirement (0% to 5%)

The Xp value is OK (< 59,02000000)



E. Data Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
17,98	35,96	427,56
20,88	41,76	537,45
23,78	47,56	782,10
26,68	53,36	925,31
29,58	59,16	1033,42

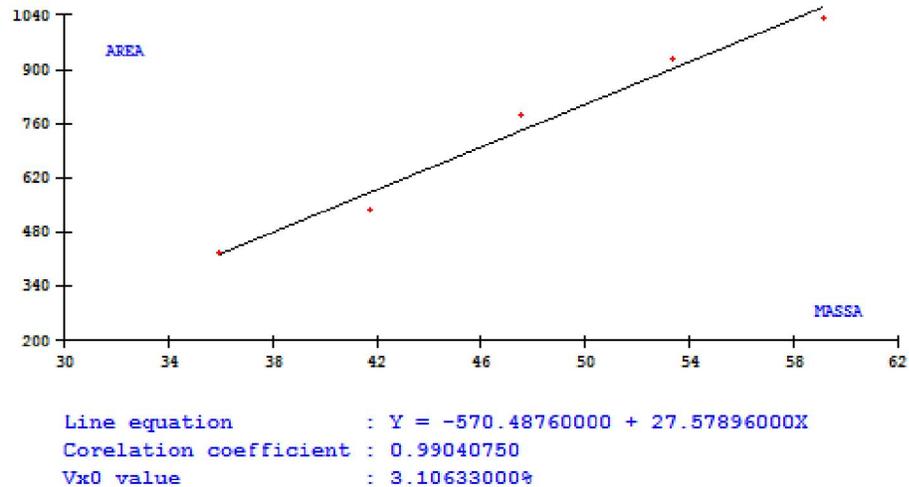
Persamaan regresi linier $Y = -570,4876 + 27,57896X$
 $r = 0,99040750$
 $V_{x0} = 3,10633\%$
 $X_p = 16,21844$

Method	: Linearity
Probability	: 95%
Number of data	: 5
Line equation	: $Y = -570,4876 + 27,57896X$
Corelation coefficient	: 0,99040750
Sy value	: 40,74435000
Vx0 value	: 3,10633000%
Xp value	: 16,21844000

The Correlation coefficient is fulfilled the requirement ($> 0,99$)

The V_{x0} value is fulfilled the requirement (0% to 5%)

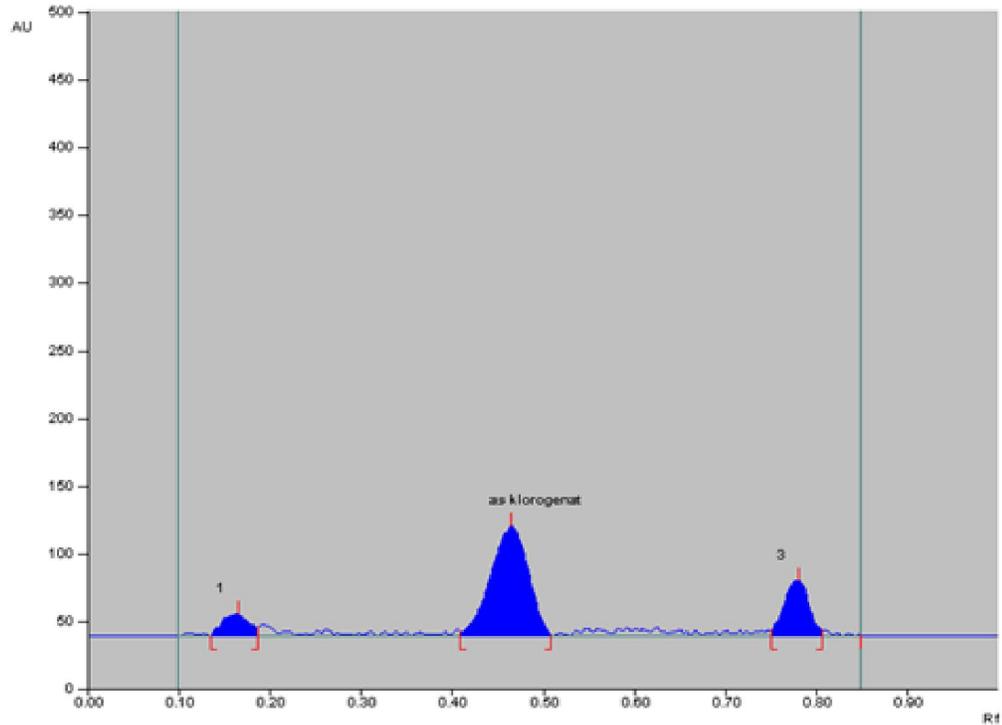
The X_p value is OK ($< 35,96000000$)



Method : DL – QL
 Number of data : 5
 DL value : 16,21844000 ng
 QL value : 48,65532000 ng

F. Data Selektivitas/Spesifisitas

F1. Kromatogram pemisahan pada ekstrak daun kopi robusta tua



Peak	Start Position	Start Height	Max Postion	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0,14Rf	0,3AU	0,17Rf	16,2AU	11,65%	0,19Rf	6,5AU	436,8AU	9,61%	Unknown*
2	0,41Rf	3,2AU	0,47Rf	81,7AU	58,83%	0,51Rf	0,3AU	3079,9AU	67,78%	As. klorogenat
3	0,75Rf	4,2AU	0,78Rf	41,0AU	29,52%	0,81Rf	4,4AU	1027,3AU	22,61%	Unknown*

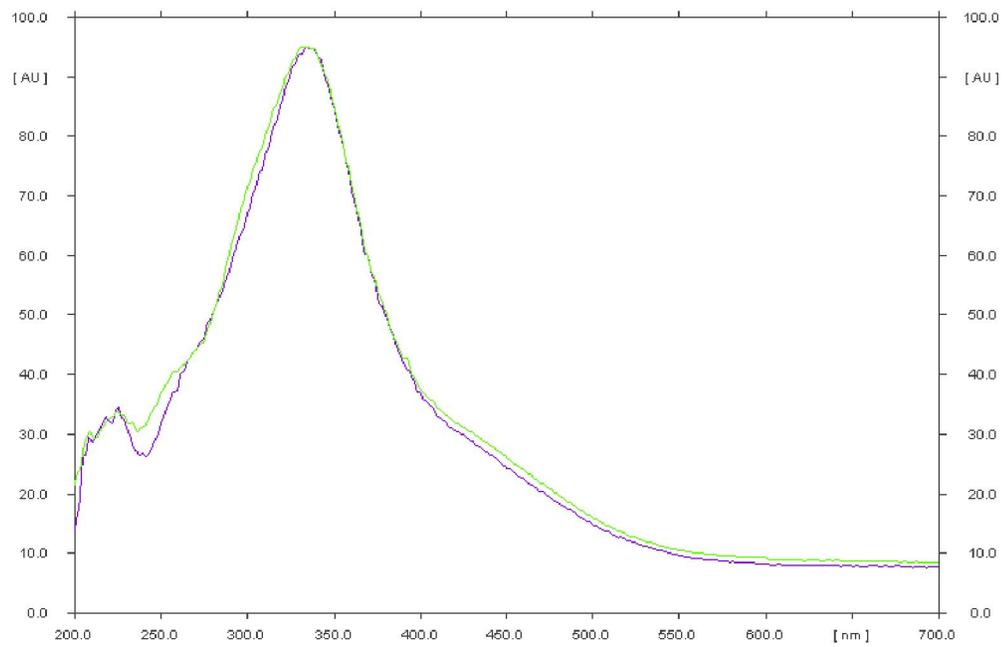
F2. Perhitungan Rs puncak asam klorogenat dengan puncak *unknown* 1

$$\begin{aligned}
 R_s &= \frac{2[(Z)_A - (Z)_B]}{W_A + W_B} \\
 &= \frac{2[0,47 - 0,17]}{(0,51 - 0,41) + (0,19 - 0,14)} \\
 &= 4,00
 \end{aligned}$$

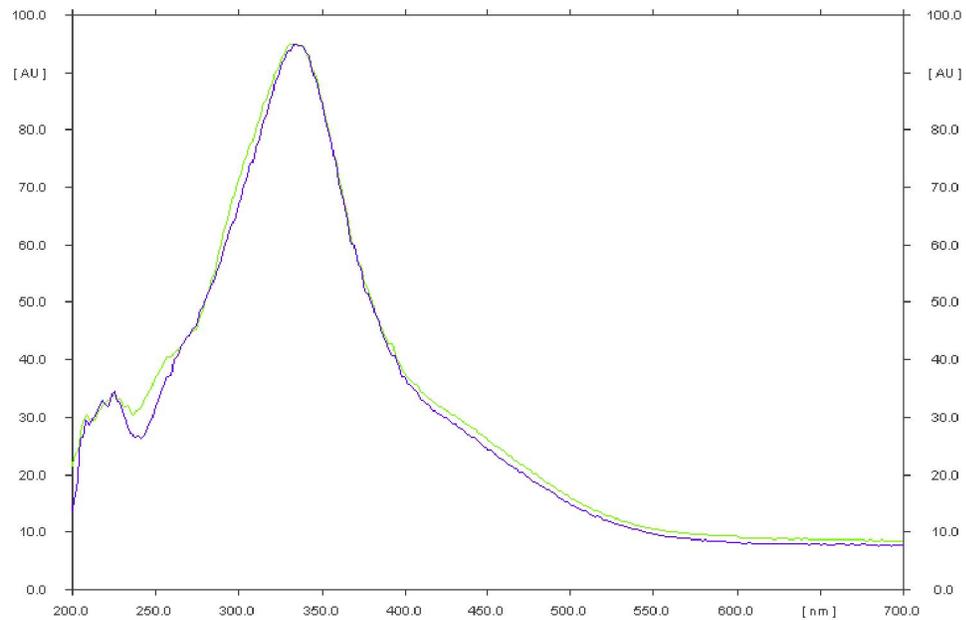
F3. Perhitungan Rs puncak asam klorogenat dengan puncak *unknown* 3

$$\begin{aligned} R_s &= \frac{2[(Z)_A - (Z)_B]}{W_A + W_B} \\ &= \frac{2[0,78 - 0,47]}{(0,81 - 0,75) + (0,51 - 0,41)} \\ &= 3,86 \end{aligned}$$

F4. Kemurnian dan identitas asam klorogenat



(a) Spektra uji kemurnian asam klorogenat dalam standar dan sampel



(b) Spektra uji identitas asam klorogenat dalam standar dan sampel

- = Spektra standar asam klorogenat
 = Spektra asam klorogenat dalam sampel

Hasil uji kemurnian asam klorogenat

Uji	Track	Rf	r(s,m)	r(m,e)	<i>Purity</i>
Kemurnian	Standar	0,52	0,999726	0,999190	OK
	Sampel	0,53	0,999743	0,999592	OK

Hasil uji identitas asam klorogenat

Uji	Track	Rf	r(s,s)	r(s,a)	<i>Identity</i>
Identitas	Standar	0,52	0,995147	0,997316	OK
	Sampel	0,53	0,995147	0,999906	OK

G. Data Presisi

G1. Hasil uji presisi hari ke-1 senyawa asam klorogenat

Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	RSD (%)
80,3	1,16	1,45	0,99
80,6	1,18	1,46	
81,0	1,20	1,49	
81,0	1,20	1,48	
80,6	1,19	1,47	
80,5	1,17	1,45	
Rata-rata		1,47	

G2. Hasil uji *intermediate precision* (uji presisi pada 3 hari berbeda dengan n=6)

Hari ke-	Kadar b/b (%)	RSD (n=6)
1	1,47	0,99 %
2	1,46	2,15 %
3	1,44	2,12 %
Rata-rata RSD		1,75 %

Perhitungan kadar asam klorogenat dari uji presisi yaitu sebagai berikut.

Misal pada replikasi 1 hari ke-1 :

$$\text{Konsentrasi analit : } \frac{93,1 \text{ ng}}{2 \mu\text{l}} = 46,55 \text{ ppm}$$

Jumlah analit dalam larutan sampel 25 ml :

$$46,55 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,025 \text{ L} = 1,16 \text{ mg}$$

Kadar asam klorogenat dalam sampel yang ditimbang :

$$\frac{1,16 \text{ mg}}{80,3 \text{ mg}} \times 100\% = 1,45\%$$

H. Data Akurasi

Hasil Akurasi Asam Klorogenat

Adisi	Penimbangan Sampel (mg)	Penambahan Standar Adisi (mg)	Massa Teoritis (ng)	Massa Hasil Percobaan (ng)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	RSD (%)
30%	80,4	0,35	122,55	126,63	103,33	102,12	1,97
	80,2	0,35	122,32	126,26	103,23		
	80,5	0,35	122,67	122,42	99,80		
45%	80,3	0,52	136,03	133,03	97,79	98,28	1,16
	80,2	0,52	135,92	132,46	97,46		
	80,1	0,52	135,80	135,23	99,58		
60%	80,7	0,68	149,30	150,16	100,57	98,75	1,61
	80,0	0,68	148,48	145,01	97,66		
	80,0	0,68	148,48	145,54	98,02		
Rata-rata						99,72	1,58

Perhitungan sampel uji akurasi dengan metode standar adisi dilakukan dengan cara sebagai berikut.

Kadar asam klorogenat pada sampel ekstrak yang dipakai pada perhitungan uji akurasi adalah 1,47% (rata-rata kadar asam klorogenat dari hasil uji presisi hari ke-1).

1. Adisi 30%

- Pembuatan sampel adisi

Bila ditimbang sampel 80 mg, maka jumlah standar asam klorogenat yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

$$\frac{80 \text{ mg} \times 1,47 \text{ mg} \times 0,3}{100 \text{ mg}} = 0,353 \text{ mg standar asam klorogenat}$$

- Pembuatan sampel adisi

Menimbang standar dengan asam klorogenat = 3,5 mg, dimasukkan labu ukur 10 ml dan ditambahkan metanol sampai tanda batas.

$$\frac{3,5 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 350 \text{ ppm}$$

Cara kerja :

- a) Menimbang 80 mg sampel, melarutkan dengan metanol kemudian memasukkan ke dalam labu ukur 25 ml.
- b) Memipet 1 ml larutan standar 350 ppm, memasukkan ke labu ukur 25 ml yang berisi larutan sampel, sehingga telah dilakukan adisi sebanyak 0,35 mg ke dalam 80 mg sampel.

$$1 \text{ ml dari } 350 \text{ ppm} = \frac{350 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times 1 \text{ ml} = 0,35 \text{ mg}$$

- c) Menambahkan metanol sampai tanda batas.

- Perhitungan % *recovery*

Misal : pada replikasi 1 dengan penimbangan sampel 80,4 mg

Konsentrasi teoritis :

$$\frac{1,47 \text{ mg}}{100 \text{ mg}} \times 80,4 \text{ mg} = 1,18 \text{ mg} + 0,35 \text{ mg}$$

$$= 1,53 \text{ mg (jumlah asam klorogenat dalam sampel adisi 30%)}$$

$$\frac{1,53 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 = 61,28 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 2 \mu\text{l} = 122,55 \text{ ng}$$

Hasil percobaan : 126,63 ng

$$\% \text{recovery} = \frac{126,63 \text{ ng}}{122,55 \text{ ng}} \times 100\% = 103,33\%$$

2. Adisi 45%

- Pembuatan sampel adisi

Bila ditimbang sampel 80 mg, maka jumlah standar asam klorogenat yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

$$\frac{80 \text{ mg} \times 1,47 \text{ mg} \times 0,45}{100 \text{ mg}} = 0,528 \text{ mg standar asam klorogenat}$$

Menimbang standar dengan asam klorogenat = 5,2 mg, dimasukkan labu ukur 10 ml dan ditambahkan metanol sampai tanda batas.

$$\frac{5,2 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 520 \text{ ppm}$$

Cara kerja :

a) Menimbang 80 mg sampel, melarutkan dengan metanol kemudian memasukkan ke dalam labu ukur 25 ml.

b) Memipet 1 ml larutan standar 520 ppm, memasukkan ke labu ukur 25 ml yang berisi larutan sampel, sehingga telah dilakukan adisi sebanyak 0,52 mg ke dalam 80 mg sampel.

$$1 \text{ ml dari } 520 \text{ ppm} = \frac{520 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times 1 \text{ ml} = 0,52 \text{ mg}$$

c) Menambahkan metanol sampai tanda batas.

- Perhitungan % *recovery*

Misal : pada replikasi 1 dengan penimbangan sampel 80,3 mg

Konsentrasi teoritis :

$$\frac{1,47 \text{ mg}}{100 \text{ mg}} \times 80,3 \text{ mg} = 1,18 \text{ mg} + 0,52 \text{ mg}$$

$$= 1,70 \text{ mg (jumlah asam klorogenat dalam sampel adisi 45%)}$$

$$\frac{1,70 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 = 68,02 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 2 \mu\text{l} = 136,03 \text{ ng}$$

Hasil percobaan : 133,03 ng

$$\% \text{recovery} = \frac{133,03 \text{ ng}}{136,03 \text{ ng}} \times 100\% = 97,79\%$$

3. Adisi 60 %

- Pembuatan sampel adisi

Bila ditimbang sampel 80 mg, maka jumlah standar asam klorogenat yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

$$\frac{80 \text{ mg} \times 1,47 \text{ mg} \times 0,6}{100 \text{ mg}} = 0,706 \text{ mg standar asam klorogenat}$$

Menimbang standar dengan asam klorogenat = 3,4 mg, dimasukkan labu ukur 10 ml dan ditambahkan metanol sampai tanda batas.

$$\frac{3,4 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 340 \text{ ppm}$$

Cara kerja :

- a) Menimbang 80 mg sampel, melarutkan dengan metanol kemudian memasukkan ke dalam labu ukur 25 ml.
- b) Memipet 2 ml larutan standar 340 ppm, memasukkan ke labu ukur 25 ml yang berisi larutan sampel, sehingga telah dilakukan adisi sebanyak 0,68 mg ke dalam 80 mg sampel.

$$2 \text{ ml dari } 340 \text{ ppm} = \frac{340 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml} = 0,68 \text{ mg}$$

- c) Menambahkan metanol sampai tanda batas.

- Perhitungan % *recovery*

Misal : pada replikasi 1 dengan penimbangan sampel 80,7 mg

Konsentrasi teoritis :

$$\frac{1,47 \text{ mg}}{100 \text{ mg}} \times 80,7 \text{ mg} = 1,18 \text{ mg} + 0,68 \text{ mg}$$

$$= 1,87 \text{ mg (jumlah asam klorogenat dalam sampel adisi 60%)}$$

$$\frac{1,87 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 = 74,65 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 2 \mu\text{l} = 149,30 \text{ ng}$$

Hasil percobaan : 150,16 ng

$$\% \text{recovery} = \frac{150,16 \text{ ng}}{149,30 \text{ ng}} \times 100\% = 100,57\%$$

I. Data Penetapan Kadar Asam Klorogenat pada Ekstrak Daun Kopi Robusta

Tua dan Muda

II. Kadar Asam Klorogenat pada Ekstrak Daun Kopi Robusta Tua

Replikasi	Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	RSD (%)
1	80,3	1,16	1,45	0,74
2	80,6	1,18	1,46	
3	80,6	1,19	1,47	
Rata-rata			1,46	

12. Kadar Asam Klorogenat pada Ekstrak Daun Kopi Robusta Muda

Replikasi	Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b (%)	RSD (%)
1	80,4	0,83	1,03	1,29
2	80,8	0,85	1,05	
3	80,4	0,83	1,03	
Rata-rata			1,04	