



**METODE KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS-DENSITOMETRI
UNTUK PENENTUAN KADAR NIKOTIN PADA BATANG TEMBAKAU**
(Nicotiana tabaccum L.)

SKRIPSI

Oleh

Linda Kartikawati

NIM 111810301026

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**METODE KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS-DENSITOMETRI
UNTUK PENENTUAN KADAR NIKOTIN PADA BATANG TEMBAKAU**

(Nicotiana tabaccum L.)

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

Linda Kartikawati

NIM 111810301026

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2016

PERSEMBAHAN

Skripsi yang berjudul “Metode KLT - Densitometri Untuk Penentuan Kadar Nikotin Pada Batang Tembakau (*Nicotiana Tabaccum L.*)” saya persembahkan kepada:

1. Ibunda Istiqomah dan Ayahanda Ashari tercinta, terimakasih atas doa, kasih sayang, dan motivasi yang tiada henti;
2. Guru-guruku di TK Sinar Nyata I, SDN Jember Lor IX, SMPN 2 Jember, SMAN 2 Jember, dan dosen-dosen di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember yang telah memberikan ilmu serta bimbingan dengan penuh kesabaran;
3. Almamater tercinta Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

.... إِنَّ اللَّهَ لَا يُغَيِّرُ مَا بِقَوْمٍ حَتَّىٰ يُغَيِّرُوا مَا بِأَنْفُسِهِمْ....

“*Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah (Nasib) suatu kaum sampai mereka mengubah diri mereka sendiri* “

(Ar-Ra'd :11)*)

“*Don't be afraid to move, because the distance 1000 miles starts by a single step*”



*) Tohaputra, Ahmad.1999. *Al Qur'an dan Terjemahnya*(Revisi Terbaru)
Departemen Agama RI. Semarang: CV Asy Syi'fa

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Linda Kartikawati


NIM : 111810301026

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Validasi Metode KLT - Densitometri Untuk Penentuan Kadar Nikotin Pada Batang Tembakau (*Nicotiana Tabaccum L.*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika temta dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 7 September 2016

Yang menyatakan,



Linda Kartikawati

NIM 111810301026

SKRIPSI

**METODE KROMATGRAFI LAPIS TIPIS - DENSITOMETRI
UNTUK PENENTUAN KADAR NIKOTIN PADA BATANG TEMBAKAU**

(Nicotiana tabaccum L.)

Oleh

Linda Kartikawati

NIM 111810301026

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Yeni Maulidah Muflihah, S.Si., M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Ika Oktaviana, S.Si., M.Sc.

PENGESAHAN

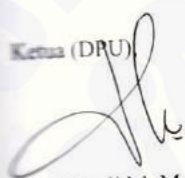
Skripsi berjudul "Metode Kromatografi Lapis Tipis - Densitometri untuk Penentuan Kadar Nikotin Pada Batang Tembakau (*Nicotiana tabaccum L.*)" telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada :

Hari, tanggal : **SENIN 26 SEP 2016**

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji

Ketua (DRU)



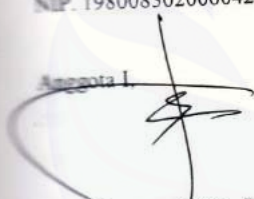
Yeni Maulidah Muflihah, S.Si., M.Si
NIP. 198008302006042002

Sekretaris (DPA),



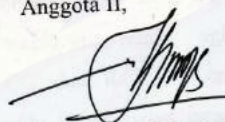
Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc.
NIP. 198010012003122001

Anggota I



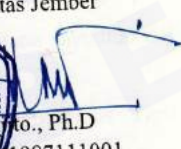
Drs. Siswoyo, M.Sc., Ph.D
NIP. 196605291993031003

Anggota II,



drh. Wuryanti Handayani, M.Si
NIP. 196008221985032002

Mengesahkan
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember



Dr. Satrio, Ph.D
NIP. 196008021987111001

RINGKASAN

Metode Kromatografi Lapis Tipis – Densitometri untuk Penentuan Kadar Nikotin Pada Batang Tembakau (*Nicotiana tabaccum L.*); Linda Kartikawati, 111810301026; 2016; 48 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Pemanfaatan tembakau selama ini terfokus pada daun tembakau. Bagian lain dari tembakau seperti batang tembakau belum banyak dimanfaatkan. Jumlahnya yang melimpah berpotensi untuk dimanfaatkan menjadi sesuatu yang lebih bermanfaat, salah satunya yaitu digunakan sebagai pestisida, karena di dalam batang tembakau terdapat adanya nikotin. Kandungan nikotin dalam batang tembakau bersifat racun terhadap serangga. Oleh karena itu, perlu dilakukan analisis nikotin pada batang tembakau untuk mengetahui kadarnya.

Metode Kromatografi Lapis Tipis – Densitometri merupakan salah satu metode analisis kadar nikotin pada batang tembakau yang dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif dalam jangka waktu yang relatif singkat serta lebih mudah diaplikasikan dibandingkan metode GC dan KCKT. Komposisi eluen merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses pemisahan dalam metode KLT, sehingga perlu dilakukan optimasi komposisi eluen. Eluen yang digunakan dalam proses optimasi yaitu campuran metanol : kloroform dengan perbandingan volume 1:4; 2:3; 1:1, campuran diklorometana : metanol dengan perbandingan volume 1:4; 2:3; 1:1, dan etil asetat : n-heksana dengan perbandingan volume 1:4; dan 2:3. Eluen metanol : kloroform (1:1) merupakan eluen yang menghasilkan pemisahan paling baik karena memiliki nilai R_f 0,6510 serta nilai standar deviasi paling kecil yaitu 0,0068.

Validasi metode analisis Kromatografi Lapis Tipis – Densitometri perlu dilakukan untuk memastikan atau mengkonfirmasi bahwa metode tersebut cocok untuk diterapkan sebagai metode analisis kadar nikotin pada batang tembakau.

Berdasarkan hasil pengujian terhadap parameter - parameter validasi yang meliputi linieritas, LOD (*limit of detection*), LOQ (*limit of quantitation*), keseksamaan (*precision*), dan kecermatan (*accuracy*).

Metode KLT – Densitometri untuk penentuan kadar nikotin pada batang tembakau dikatakan valid karena memenuhi persyaratan uji validitas yaitu uji linier dengan nilai $r = 0,998$; LOD dan LOQ dengan nilai 66,72 ng dan 222,4 ng; presisi dengan nilai 3-6,28 %; dan akurasi dengan nilai 80 % - 100 %. Kadar nikotin yang diperoleh dari sampel batang tembakau sebesar $0,015 \pm 0,001$ %.

PRAKATA

Puji syukur dipanjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat dan hidayah-Nya berupa kemampuan berpikir dan analisis sehingga dapat terselesaikan skripsi yang berjudul “Validasi Metode KLT - Densitometri Untuk Penentuan Kadar Nikotin Pada Batang Tembakau (*Nicotiana tabaccum L.*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Kimia (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember.

Skripsi ini tidak mungkin terselesaikan dengan baik tanpa adanya komitmen dan kerjasama yang harmonis antara berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Ibu Yeni Maulidah Muflihah, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Ika Oktaviana, S.Si., M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan bimbingan, motivasi, dan perhatian dalam penyelesaian studi di Jurusan Kimia serta penyelesaian skripsi;
4. Drs. Siswoyo M. Sc., PhD., selaku dosen Penguji I, dan drh. Wuryanti Handayani M.Si., selaku dosen penguji II yang telah memberikan masukan-masukan dan perbaikan dalam penyusunan skripsi;
5. Kepala Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah memberikan kesempatan untuk menggunakan fasilitas laboratorium;
6. Ibunda tercinta Istiqomah yang tiada henti memberikan motivasi, nasehat dan semangat untuk menyelesaikan penyusunan skripsi ini;
7. Ayahanda tercinta Ashari terimakasih untuk semua nasehat, didikan, kasih sayang, pengorbanan dan pelajaran hidup yang berharga;

8. Kakak dan adikku tercinta Febriana Prihartini dan Angga Nurmansyah yang telah memberikan motivasi dan selalu menemani dalam suka dan duka;
9. *Nicotine team*, Siti Zu yang telah setia menjadi parner seperjuangan, berbagi suka dan duka bersama;
10. Anis, Dewanti, dan Yuli terima kasih atas semangat, masukan, perhatian, canda tawa dan semua kenangan yang tak kan terlupakan;
11. Teman – teman seperjuangan SOLVENT 2011 tanpa terkecuali yang telah menjadi teman berbagi ilmu, memberikan masukan, motivasi dan semangat sehingga skripsi dan studi di Jurusan Kimia terselesaikan dengan baik;
12. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan.

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5

2.1 Tanaman Tembakau.....	5
2.2 Kandungan Batang Tembakau.....	6
2.3 Alkaloid.....	7
2.3.1 Klasifikasi Alkaloid	8
2.3.2 Isolasi Alkaloid	8
2.3.3 Nikotin	9
2.3.4 Nikotin sebagai Pestisida	11
2.4 Ekstraksi Nikotin	11
2.5 Kromatografi Lapis Tipis	13
2.6 Optimasi Eluen Kromatografi Lapis Tipis.....	15
2.7 Densitometri	16
2.8 Validasi Metode.....	18
2.8.1 Linieritas	18
2.8.2 Batas Deteksi (LOD)	19
2.8.3 Batas Kuantisasi (LOQ).....	19
2.8.4 Kecermatan (<i>Accuracy</i>)	20
2.8.5 Presisi (<i>Precision</i>).....	20
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
3.2 Alat dan Bahan.....	22
3.2.1 Alat.....	22
3.2.2 Bahan	22
3.3 Diagram Alir Penelitian	23

3.4 Prosedur Penelitian.....	24
3.4.1 Pembuatan Larutan Induk Nikotin 1000 ppm.....	24
3.4.2 Preparasi Sampel.....	24
3.4.3 Penentuan Kadar Air.....	24
3.4.4 Ekstraksi Nikotin	24
3.4.5 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum.....	25
3.4.6 Aktivasi Plat KLT Silika Gel F ₂₅₄	25
3.4.7 Optimasi Komposisi Eluen	25
3.4.8 Validasi Metode	26
3.4.8.1 Uji Linieritas	26
3.4.8.2 Limit Deteksi dan Kuantitasi	27
3.4.8.3 Kecermatan (<i>Accuracy</i>)	27
3.4.8.4 Keseksamaan (<i>Precision</i>)	28
3.4.9 Analisis Nikotin Pada Batang Tembakau	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1 Optimasi Komposisi Eluen.....	29
4.2 Validitas Metode KLT - Densitometri	31
4.2.1 Panjang Gelombang Maksimum Nikotin	32
4.2.2 Linieritas	33
4.2.3 Limit Deteksi dan Kuantitasi	34
4.2.4 Keseksamaan (<i>Precision</i>)	35
4.2.5 Kecermatan (<i>Accuracy</i>)	37
4.3 Kadar Nikotin dalam Batang Tembakau	38

4.3.1 Kadar Air	38
4.3.2 Ekstraksi Nikotin dari Batang Tembakau	38
4.3.3 Kadar Nikotin yang diperoleh dalam Batang Tembakau.....	40
BAB 5. PENUTUP.....	44
5.1 Kesimpulan.....	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi kimia batang tembakau	7
2.2 Urutan polaritas eluen	16
4.1 Data hasil optimasi eluen KLT untuk larutan standar nikotin	30
4.2 Data hasil optimasi KLT larutan sampel dengan eluen metanol:kloroform ..	30
4.3 Data limit deteksi dan limit kuantisasi	35
4.4 Data presisi larutan standar nikotin	36
4.5 Data persen perolehan kembali (<i>recovery</i>)	37
4.6 Data kadar nikotin dalam batang tembakau	42

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman Tembakau	5
2.2 Struktur kimia jenis-jenis alkaloid	8
2.3 Struktur nikotin	9
2.4 Skema metabolisme nikotin pada tanaman tembakau	10
2.5 Biosintesis nikotin	10
2.6 Ekstraktor sokhlet	12
2.7 Proses pengembangan dan penjualan	14
2.8 Ilustrasi model <i>scanning</i> densitometer	17
2.9 Kurva kalibrasi daerah linier	18
4.1 Grafik <i>scanning</i> panjang gelombang maksimum nikotin	32
4.2 Kurva penentuan daerah linier	33
4.3 Kurva kalibrasi daerah linier	34
4.4 Reaksi penggaraman nikotin dalam larutan HCl	39
4.5 Reaksi pembasaan nikotin dalam larutan NaOH	40
4.6 Densitogram larutan standar nikotin 100 ppm	41
4.7 Densitogram sampel nikotin dalam ekstrak batang tembakau	42

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Prosedur Pembuatan Larutan Standar Nikotin.....	49
B. Data Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Standar Nikotin (<i>Scanning</i>)	51
C. Data Optimasi Komposisi Eluen.....	52
C.1 Hasil Perhitungan R_f dan Standar Deviasi Noda pada KLT	52
C.2 Hasil Optimasi Larutan Sampel dengan Eluen Metanol : Kloroform	52
C.3 Kromatogram Hasil Analisis Menggunakan KLT	53
C.4 Hasil Kromatogram Sampel dengan Eluen Metanol : Kloroform.....	56
C.5 Densitogram Standar dengan Eluen Metanol : Kloroform.....	57
C.6 Densitogram Sampel dengan Eluen Metanol : Kloroform	61
D. Data Perhitungan Kadar Air.....	66
E. Data Validasi Metode.....	67
E.1 Linieritas	67
E.2 LOD dan LOQ	72
E.3 Densitogram Larutan Blanko.....	73
E.4 Kecermatan (<i>Accuracy</i>)	74
E.5 Keseksamaan (<i>Precision</i>)	87
F. Data Penentuan Kadar Nikotin Dalam Batang Tembakau.....	90
G. Gambar Kromatogram Validasi Metode.....	95

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kabupaten Jember terkenal sebagai salah satu penghasil tembakau terbaik di dunia. Melalui potensi tanaman tembakau ini, kabupaten Jember tak hanya dikenal di pasar nasional, tapi juga di beberapa negara di Eropa (Suryanto, 2012).

Pemanfaatan tembakau selama ini terfokus pada daun tembakau. Bagian lain dari tembakau seperti batang tembakau belum banyak dimanfaatkan. Jumlahnya yang melimpah berpotensi untuk dimanfaatkan menjadi sesuatu yang lebih bermanfaat (Amin *et. al.*, 2008). Piotrowska *et. al.* (2009) melakukan penelitian dan mendapatkan hasil bahwa beberapa senyawa kimia seperti nikotin dan solanesol dapat diekstraksi dari limbah tembakau dan dimanfaatkan sebagai pestisida. Penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al.* (2015) untuk menentukan nikotin pada batang tembakau varietas China dideteksi dengan alat auto analyzer, mendapatkan kandungan nikotin sebesar 0,26 %, selulosa dan lignin berturut-turut sebesar 56,10% dan 15,11%. Nikotin berupa cairan bening berwarna agak kuning mempunyai kenampakan seperti minyak, larut dalam air dan juga larut dalam pelarut organik pada umumnya, seperti etanol, petroleum eter, dan kloroform (Mursyidi, 1990).

Metode analisis nikotin pada tembakau yang sudah pernah dilakukan antara lain Gas Kromatografi (GC) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) seperti yang dilakukan oleh Ernesta (2011). Metode tersebut selektif dalam memisahkan senyawa multi komponen dengan hasil pemisahan yang baik serta waktu yang relatif singkat, namun alat tersebut relatif mahal penggunaannya. Metode lain yang dapat digunakan untuk penentuan kadar nikotin pada daun tembakau Burley oleh Wu Ching *et al.* (1998) yaitu menggunakan *supercritical fluid chromatography – ion mobility detection* (SFC-IMD) yang menawarkan kesensitifan tinggi, deteksi spesifik nikotin,

dan instrumentasi berbiaya rendah, namun dalam mengaplikasiannya alat tersebut cukup rumit.

Metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk penentuan kadar nikotin dalam batang tembakau karena dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif dalam jangka waktu yang relatif singkat. Metode KLT-Densitometri dapat digunakan untuk menganalisis senyawa tunggal berupa nikotin yang terdapat dalam fraksi kloroform ekstrak etanolik batang tembakau. Metode KLT-Densitometri relatif sederhana, cepat dalam pemisahan, sensitif serta kecepatan pemisahan tinggi (Khopkar, 1990).

Sistem KLT yang digunakan dalam penelitian ini adalah sistem normal yaitu fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak hasil optimasi. Optimasi perlu dilakukan untuk mendapatkan kondisi yang optimum sehingga diperoleh pemisahan senyawa tunggal berupa nikotin dari campuran senyawa lain yang terdapat dalam sampel batang tembakau. Kondisi optimum diperoleh dengan mengoptimasi jenis dan perbandingan komposisi fase gerak yang sesuai untuk mengelusi nikotin (Chairio, 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Yuni (2006) mengisolasi nikotin dari daun tembakau dengan sistem KLT menggunakan eluen n-heksana dan metanol dengan perbandingan 7:3 menghasilkan nilai R_f larutan nikotin sebesar 0,75, sedangkan Chairio (2011) mengisolasi nikotin dari fraksi kloroform ekstrak etanolik daun tembakau menggunakan eluen kloroform:metanol dengan perbandingan volume 22,5:2,5 mL menghasilkan nilai R_f sebesar 0,62. Daya elusi dari fase gerak yang dipilih harus diantara nilai R_f sebesar 0,2 – 0,8 (Gritter *et al.*, 1991).

Validasi metode analisis bertujuan untuk memastikan dan mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai dengan peruntukannya. Validasi metode sangat diperlukan karena beberapa alasan yaitu validasi metode merupakan elemen penting dari kontrol kualitas, validasi membantu memberikan jaminan bahwa pengukuran akan dapat diandalkan, dalam beberapa bidang validasi metode adalah persyaratan peraturan (Riyanto, 2014).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini bertujuan untuk memberikan informasi mengenai kadar nikotin pada batang tembakau yang dianalisis secara kuantitatif menggunakan KLT - Densitometri, serta mendapatkan metode KLT-Densitometri yang valid untuk penentuan kadar nikotin dalam batang tembakau (*Nicotiana tabacum*) berdasarkan parameter linieritas, LOD dan LOQ, akurasi, dan presisi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang diuraikan di atas, maka perumusan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Bagaimana komposisi eluen optimum untuk pemisahan nikotin menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis - Densitometri ?
2. Bagaimana validitas metode Kromatografi Lapis Tipis – Densitometri untuk analisis nikotin ?
3. Berapa kadar nikotin pada batang tembakau?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Sampel batang tembakau diambil dari jenis tembakau Na Oogst di PTPN X Ajung, Jember.
2. Eluen yang digunakan yaitu campuran 2 pelarut antara lain: kloroform:metanol; metanol:diklorometana; dan etil asetat:n-heksana.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui komposisi eluen yang menghasilkan pemisahan nikotin paling baik menggunakan metode KLT – Densitometri.
2. Mengetahui validitas metode KLT – Densitometri untuk analisis nikotin
3. Mengetahui kadar nikotin pada batang tembakau.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai metode KLT-Densitometri sebagai metode penentuan kadar nikotin dalam batang tembakau (*Nicotiana tabacum*) yang memenuhi parameter linieritas, LOD dan LOQ, akurasi, dan presisi.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tembakau

Tembakau termasuk golongan tanaman semusim, dalam dunia pertanian tergolong dalam tanaman perkebunan. Tembakau diklasifikasikan sebagai berikut:

- Divisio : Spermatophyta
- Sub divisio : Angiospermae
- Class : Dicotyledoneae
- Ordo : Personatae
- Famili : Solanaceae
- Genus : Nicotiana
- Spesies : *Nicotiana tabaccum* L.

(Matnawi, 1997).



Gambar 2.1 Tanaman Tembakau (Sumber: Matnawi, 1997)

Tanaman tembakau memiliki akar tunggang, jika tanaman tumbuh bebas pada tanah yang subur terkadang dapat tumbuh sepanjang 7,5 cm. Selain akar tunggang terdapat bulu-bulu akar dan akar serabut. Akar tanaman tembakau kurang tahan

terhadap air yang berlebihan karena dapat mengganggu pertumbuhan akar bahkan tanaman dapat mati (Matnawi, 1997).

Daun tembakau berbentuk lonjong atau bulat, tergantung pada varietasnya. Daun yang berbentuk bulat lonjong ujungnya berbulat runcing, sedangkan berbentuk bulat ujungnya berbentuk tumpul. Daun memiliki tulang-tulang menyirip, bagian tepi daun agak bergelombang dan licin. Ketebalan daun yang berbeda-beda, tergantung varietas budidaya. Daun tumbuh berselang-seling mengelilingi batang tanaman. Daun memiliki mulut daun yang terletak merata. Jumlah daun dalam satu tanaman 28-32 helai (Cahyono, 1998).

Tembakau termasuk *sub-family Nicotianae* dan genus *Nicotiana*. Dari sekian banyak *species*, yang mempunyai nilai ekonomis paling tinggi diantaranya spesies *Nicotiana tabacum* dan *Nicotiana rustica*. Kedua spesies tembakau ini bisa dibedakan dari bentuk dan warna bunganya. Lebih teliti lagi, kedua spesies ini dapat dibedakan dengan menggunakan mikroskop. Walaupun keduanya dalam keadaan diploid mempunyai jumlah kromosom yang sama yaitu 48, tetapi di bawah mikroskop bentuknya mudah dibedakan. Beberapa spesies lainnya cukup dikenal baik, tetapi tidak mempunyai nilai ekonomi terlalu tinggi dan lebih banyak dikenal sebagai tanaman hias (Matnawi, 1997).

2.2 Batang Tembakau

Batang tanaman tembakau berbentuk agak bulat, batangnya agak lunak tetapi kuat; makin ke ujung semakin kecil. Ruas-ruas batang mengalami penebalan yang ditumbuhi daun; batang tanaman tidak bercabang atau sedikit bercabang. Pada setiap ruas batang selain ditumbuhi daun juga ditumbuhi tunas yang disebut tunas ketiak daun. Diameter batang sekitar 5 cm (Cahyono, 1998). Komposisi kimia pada batang tembakau sehat varietas China menurut penelitian Liu *et.al* (2015) dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi Kimia Batang Tembakau (Liu *et. al.*, 2015)

Parameters	HTS	WS	RS	PM	CM	TL	Inoculum
TS (%)	94.11 ± 0.06	92.63 ± 0.08	94.09 ± 0.17	26.02 ± 0.55	24.32 ± 0.97	12.16 ± 0.34	12.76 ± 0.08
VS (%)	87.93 ± 0.13	75.19 ± 1.26	87.87 ± 0.19	20.83 ± 0.45	20.08 ± 0.84	10.77 ± 0.14	8.03 ± 0.04
Cellulose (%)	56.10 ± 0.24	47.01 ± 0.38	53.78 ± 2.14	9.70 ± 1.05	27.43 ± 1.76	-	-
HC (%)	22.44 ± 0.20	20.65 ± 0.35	18.69 ± 0.34	3.05 ± 0.36	11.84 ± 1.92	-	-
TOC (%)	44.61 ± 3.44	40.57 ± 2.75	43.90 ± 2.10	8.34 ± 1.33	12.07 ± 0.98	-	6.89 ± 0.41
TN (%)	0.83 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.51 ± 0.09	0.84 ± 0.05	0.81 ± 0.04	-	1.25 ± 0.04
C:N	53.75	88.20	86.08	9.93	14.90	-	5.51
Lignin (%)	15.11 ± 2.33	16.33 ± 4.15	13.92 ± 1.97	7.57 ± 1.49	11.72 ± 3.36	-	5.32 ± 0.37
Nicotine (%)	0.26 ± 0.08	-	-	-	-	-	-

HTS is healthy tobacco stalk without virus, WS is wheat stalk, RS is rape stalk, PM is pig manure, CM is cow manure, TL is tobacco leaves with virus. HC is hemi-cellulose, TOC is total organic carbon, TN is total nitrogen, C:N is carbon nitrogen ratio.

2.3 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen dan biasanya berupa sistem siklik. Alkaloid mengandung atom karbon, hidrogen, nitrogen dan pada umumnya mengandung oksigen. Senyawa alkaloid banyak terkandung dalam akar, biji, kayu maupun daun dari tumbuhan dan juga dari hewan. Senyawa alkaloid merupakan hasil metabolisme dari tumbuh-tumbuhan dan digunakan sebagai cadangan bagi sintesis protein. Kegunaan alkaloid bagi tumbuhan adalah sebagai pelindung dari serangan hama, penguat tumbuhan dan pengatur kerja hormon. Alkaloid mempunyai efek fisiologis. Sumber alkaloid adalah tanaman berbunga, angiospermae, hewan, serangga, organisme laut dan mikroorganisme. Famili tanaman yang mengandung alkaloid adalah *Liliaceae*, *solanaceae*, *rubiaceae*, dan *papaveraceae* (Tobing, 1989).

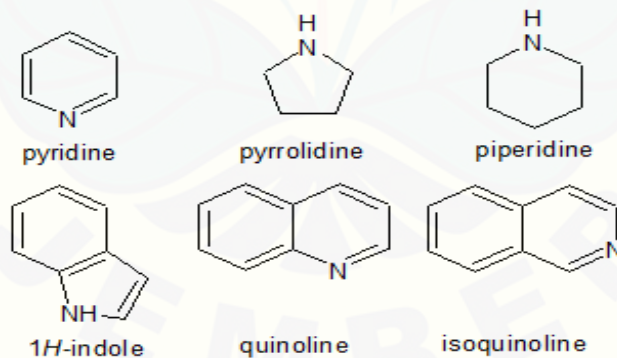
Sifat-sifat alkaloid:

- a. Biasanya merupakan kristal tak berwarna, tidak mudah menguap, tidak larut dalam air, larut dalam pelarut organik. Beberapa alkaloid berwujud cair dan larut dalam air. Ada juga alkaloid yang berwarna, misalnya berberin (kuning).
- b. Bersifat basa (pahit, racun).

- c. Mempunyai efek fisiologis serta aktif optis.
 - d. Dapat membentuk endapan dengan larutan asam fosfowolframat, asam fosfomolibdat, asam pikrat, dan kalium merkuriiodida.
- (Tobing, 1989).

2.3.1 Klasifikasi Alkaloid

Alkaloid tidak mempunyai nama yang sistematis, sehingga nama dinyatakan dengan nama trivial misalnya kodein, morfin, heroin, kinin, kofein, nikotin. Hampir semua nama trivial diberi akhiran -in yang mencirikan alkaloid. Sistem klasifikasi alkaloid yang banyak diterima adalah pembagian alkaloid menjadi 3 golongan yaitu alkaloid sesungguhnya, proto alkaloid dan pseudoalkaloid. Suatu cara mengklasifikasikan alkaloid adalah cara yang didasarkan jenis cincin heterosiklik nitrogen yang merupakan bagian dari struktur molekul. Jenis alkaloid diantaranya pirolidin, piperidin, kuinolin, isokuinolin, indol, piridin dan sebagainya seperti dilihat pada gambar 2.2 (Robinson, 1995).



Gambar 2.2 Struktur jenis-jenis alkaloid (Robinson, 1995)

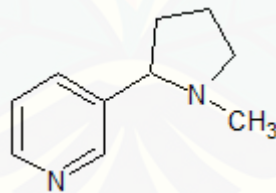
2.3.2 Isolasi Alkaloid

Alkaloid dapat di ekstrak dari beberapa bagian tumbuhan yaitu daun, bunga, buah, kulit, dan akar yang dikeringkan lalu dihaluskan. Cara ekstraksi alkaloid secara umum adalah sebagai berikut:

- a. Alkaloid di ekstrak dengan pelarut tertentu, misalnya dengan etanol, kemudian diuapkan.
- b. Ekstrak yang diperoleh diberi asam anorganik untuk menghasilkan garam amonium kuartener kemudian diekstrak kembali.
- c. Garam amonium kuartener yang diperoleh direaksikan dengan natrium karbonat sehingga akan menghasilkan alkaloid-alkaloid yang bebas kemudian diestraksi dengan pelarut tertentu seperti eter dan kloroform.
- d. Campuran-campuran alkaloid yang diperoleh kemudian dipisahkan melalui berbagai cara, misalnya metode kromatografi (Tobing, 1989).

2.3.3 Nikotin

Nikotin adalah suatu alkaloid yang memiliki nama kimia 3-(1-metil-2-pirolidil) *piridin*. Saat diekstraksi dari daun tembakau, nikotin tak berwarna, tetapi segera menjadi coklat ketika bersentuhan dengan udara. Nikotin dapat menguap dan dapat dimurnikan dengan cara penyulingan uap dari larutan yang dibasakan. Struktur kimia dari nikotin dapat dilihat pada gambar 2.3.

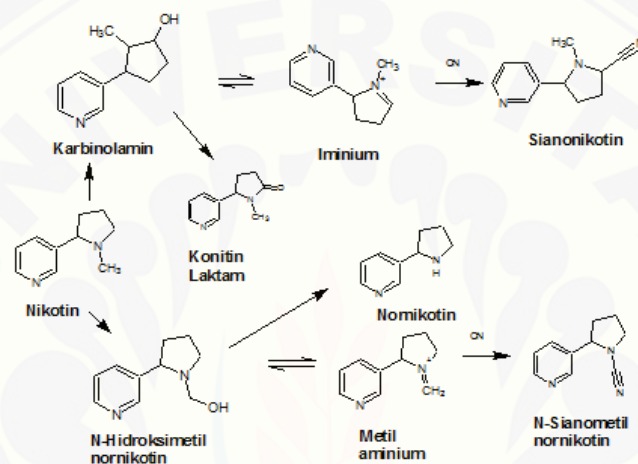


Gambar 2.3 Struktur Nikotin (Wolff, 1994)

Nikotin adalah bahan alkaloid toksik yang merupakan senyawa amina tersier, bersifat basa lemah dengan pH 8, pada pH tersebut sebanyak 31% nikotin berbentuk ion dan dapat melewati membran sel. Nikotin secara alami terdapat pada tanaman tembakau. Nikotin juga dapat ditemukan pada tanaman-tanaman lain dari famili biologis *Solanaceae* seperti tomat, kentang, terong, dan merica hijau pada level yang sangat kecil dibanding pada tembakau. Zat alkaloid yang telah diketahui memiliki

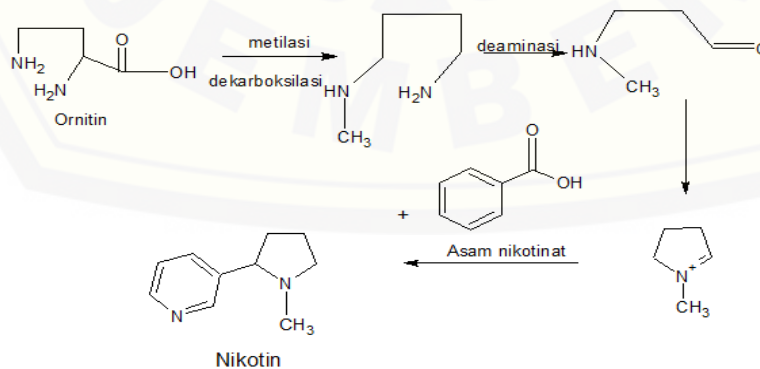
sifat farmakologi, seperti efek stimulan dari kafein yang meningkatkan tekanan darah dan detak jantung (Wolff, 1994).

Alkaloid nikotin mengalami proses metabolisme, yaitu suatu proses dimana nikotin mengalami perubahan struktur karena adanya senyawa-senyawa kimia di sekitarnya. Proses metabolisme nikotin dalam tembakau disajikan pada gambar 2.4



Gambar 2.4 Skema Metabolisme Nikotin Pada Tembakau (Wolff, 1994)

Pembentukan struktur *N*-(sianometil) normikotin didapatkan dari penyerangan nukleofilik oleh ion sianida pada senyawa antara jenis metil iminium. Senyawa ini dibentuk dengan ionisasi jenis *N* hidroksimetil normikotin. Senyawa antara karbinolamin yang sama terlihat pada *N*-demetilasi dari nikotin menjadi normikotin (Wolff, 1994).



Gambar 2.5 Biosintesis Nikotin (Wolff, 1994)

Nikotin dapat disintesis dari sebuah asam amino yaitu ornitin (dapat dilihat pada gambar 2.5). Cincin pirolidin berasal dari asam amino ornitin dan cincin piridin berasal dari asam nikotinat yang ditemukan dalam tumbuhan tembakau. Gugus amino yang terikat pada ornitin digunakan untuk membentuk cincin pirolidin dari nikotin (Wolff, 1994).

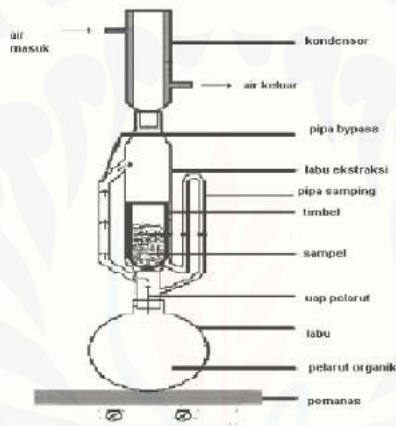
2.3.4 Nikotin Sebagai Pestisida

Nikotin pertama kali digunakan sebagai insektisida pada tahun 1763, dan alkaloid murninya diisolasi tahun 1828 oleh Posset dan Reimann, kemudian disintesis tahun 1904 oleh Piclet dan Rotschy. Alkaloid nikotin, nikotin sulfat dan senyawa nikotin lainnya digunakan sebagai racun kontak, fumigasi, dan racun perut. Insektisida ini diperdagangkan sebagai *Black Leaf 40^R* mengandung 40% nikotin, untuk mengendalikan serangga yang lunak tubuhnya. Nikotin didapatkan dari *Nicotiana tabaccum* dengan kadar 2 – 5% dan *Nicotiana rustica* dengan kadar 5 – 14%. Nikotin diekstrak dengan alkali dan didistilasi uap air menggunakan benzene, trikloro etilen, atau eter. Nikotin pada umumnya terdiri atas 97% alkaloid dari tembakau (Baehaki, 1993).

2.4 Ekstraksi Nikotin

Ekstraksi merupakan pemisahan senyawa tertentu dari campuran menggunakan pelarut. Berbeda dengan proses separasi yang lain, ekstraksi menghasilkan senyawa tidak murni, karena setelah proses tersebut senyawa yang diinginkan masih tercampur dengan pelarut. Senyawa yang dipisahkan terdapat dalam campuran yang berupa cairan, sedangkan ekstraksi padat-cair adalah suatu metode pemisahan senyawa dari campurannya yang berupa padatan. Semakin banyak pengulangan dalam ekstraksi, maka semakin besar jumlah senyawa yang terekstrak dari campurannya atau efektivitas ekstraksi semakin tinggi (Basset *et al.*, 1989).

Cara ekstraksi senyawa padat-cair dengan prosedur klasik adalah menggunakan ekstraksi kontinyu dengan alat ekstraktor soxhlet. Cara kerja dengan ekstraksi pelarut menguap cukup sederhana yaitu bahan dimasukkan ke dalam ketel ekstraktor. Pelarut akan berpenetrasi ke dalam bahan dan melarutkan minyak beserta beberapa jenis lilin, albumin, dan zat warna (Guenther, 1987). Ekstrak yang diperoleh disaring dengan penyaringan vakum, lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* vakum yang akan memekatkan larutan tanpa terjadi percikan pada temperatur antara 30 sampai 40°C (Harborne, 1987).



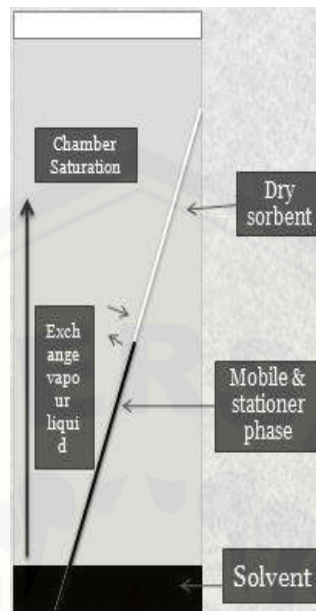
Gambar 2.6 Ekstraktor Sokhlet (Furniss, *et al.*, 1980)

Ekstraksi dengan pelarut dapat dilakukan secara *batch* atau kontinyu. Proses *batch* cenderung kurang efisien dibanding proses kontinyu. Contoh proses ekstraksi kontinyu pada bahan padat adalah dengan ekstraktor sokhlet sedangkan proses *batch* adalah maserasi yaitu merendam bahan dalam pelarut selama waktu tertentu (Furniss *et al.*, 1980). Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi harus memenuhi kriteria sebagai berikut: melarutkan semua zat, titik didih cukup rendah sehingga mudah diuapkan, tidak larut dalam air dan bersifat inert. Pelarut yang memiliki sifat paling mendekati kriteria di atas adalah petroleum eter, dengan titik didih 30-70°C, sifat stabil, mudah menguap, selektif dalam melarutkan zat. Petroleum eter terdiri dari beberapa fraksi hidrokarbon seperti pentana, heptana, heksana dan sebagainya (Furniss *et al.*, 1980).

2.5 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu analisis kualitatif dan kuantitatif yang menggunakan prinsip dasar pada kromatografi yaitu pemisahan campuran berdasarkan perbedaan adsorpsi dan distribusi senyawa pada dua fase yang berbeda yaitu fase diam dan fase gerak. Empat macam adsorben (fase diam) yang umum dipakai ialah silika gel (asam silikat), alumina (aluminium oksida), kieselguhr (*diatomeus earth*), dan selulosa. Adsorben sebagai fase diam yang sering digunakan dalam analisis alkaloid adalah plat KLT silika gel F₂₅₄ (IAEA, 2005). Permukaan silika gel sangat polar karena terdapat gugus hidroksi dapat membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa-senyawa yang sesuai disekitarnya, sebagaimana halnya gaya Van Der Waals dan atraksi dipol-dipol (Clark, 2007).

Fase gerak (eluen) yang digunakan adalah pelarut tunggal maupun campuran beberapa pelarut organik atau anorganik yang bersifat polar atau nonpolar. Pemilihan fase gerak sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat kimia yang dipisahkan. Komposisi pelarut pengembang campuran umumnya melalui perbandingan volume (v/v). Pengembangan adalah suatu proses pemisahan analit dari sampel berdasarkan pengaruh pergerakan eluen yang merambat pada fase diam karena adanya gaya kapilaritas. Proses pengembangan lebih baik bila ruangan pengembangan tersebut telah jenuh dengan uap sistem pelarut. Pengembangan dilakukan dalam ruangan tertutup dan diakhiri setelah ujung pelarut pada plat telah mencapai kira-kira $\frac{3}{4}$ tinggi adsorben. Plat KLT kemudian diambil dan dikeringkan (Stahl, 1985). Berikut adalah proses pengembangan dan penjenuhan yang dapat dilihat pada gambar 2.7.



Gambar 2.7 Proses Pengembangan dan Penjenuhan (Spangenberg *et al.*, 2011)

Kromatogram pada KLT merupakan noda-noda yang terpisah dan tampak setelah dilakukan visualisasi secara fisika atau kimia. Noda kromatogram tiap-tiap komponen yang terpisah secara visualisasi tampak sebagai noda yang bulat apabila terjadi pemisahan yang baik. Konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terjadinya kromatogram yang tidak bulat (berekor). Penyebab pengekoran yang lain adalah ketidakjenuhan chamber KLT, ketidaktepatan pemilihan fase gerak terhadap fase diam, dan macam sampel yang dianalisis (Mulja & Suharman, 1995).

Penggunaan umum KLT adalah untuk menentukan banyak komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, dan menentukan efektivitas pemurnian (Gandjar, 2007). Analisis kualitatif pada KLT ditentukan dengan membandingkan nilai R_f (*Retardation Factor*) sampel dengan nilai R_f senyawa standar untuk kondisi kromatografi yang sama dan plat yang sama (Mulja & Suharman, 1995). Nilai R_f diantara 0,2-0,7 dapat menghasilkan pemisahan yang baik (Gritter *et. al.*, 1991). Definisi R_f sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi komponen}}{\text{Jarak migrasi pelarut}}$$

Analisis kuantitatif dengan KLT dapat dilakukan dengan dua cara. Pertama, bercak diukur langsung pada lempeng dengan menggunakan ukuran luas atau dengan teknik densitometri. Cara kedua dengan cara mengerok bercak lalu menetapkan kadar senyawa yang terdapat pada bercak tersebut dengan metode analisis yang lain, misalkan dengan metode spektrofotometri. Analisis kuantitatif dari suatu senyawa yang telah dipisahkan dengan KLT biasanya dilakukan dengan densitometri langsung pada lempeng KLT (Mulja & Suharman, 1995).

2.6 Optimasi Eluen Kromatografi Lapis Tipis

Pemilihan eluen pengembang (fase gerak) dalam metode KLT sangat mempengaruhi proses pemisahan. Pemilihan fase gerak dapat mengacu pada literatur pustaka untuk menentukan pelarut yang sesuai (Sherma & Fried, 2003).

Pemisahan komponen nonpolar atau hidrofobik (tidak larut dalam air) pada proses pemisahan adsorpsi digunakan pelarut pengembang yang bersifat nonpolar dan sampel polar pelarut pengembang yang bersifat polar (Mulja & Suharman, 1995).

Fase gerak (eluen) harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik pemisahan yang sangat sensitif. Daya elusi fase gerak yang dipilih harus dapat memberikan harga R_f analit diantara 0,2-0,7 guna memaksimalkan pemisahan. Campuran pelarut dianjurkan digunakan untuk sekali pengembangan saja, sebab susunannya mudah berubah akibat salah satu komponennya menguap (Gritter *et al.*, 1991).

Urutan kepolaran eluen, elusi senyawa, dan kekuatan adsorben dalam kromatografi disajikan dalam tabel 2.2. Urutan kepolaran eluen, elusi senyawa, dan kekuatan adsorben adalah sebagai berikut:

Tabel 2.2 Urutan kepolaran eluen, elusi senyawa, dan kekuatan adsorben

Urutan Polaritas Eluen	Urutan Elusi Senyawa	Urutan Adsorben
n-heksana	Hidrokarbon tak jenuh	Selulosa
Petroleum eter	Alkena	Gula
Sikloheksana	Hidrokarbon aromatik	Silika gel
Trikloroetana	Eter	Firosil (Mg Silikat)
Toluena	Aldehida, keton, ester	Aluminium oksida
Diklorometana	Alkohol	
Kloroform	Asam karboksilat	
Etil eter		
Etil asetat		
Asetone		
n-propanol		
Etanol		
Air		

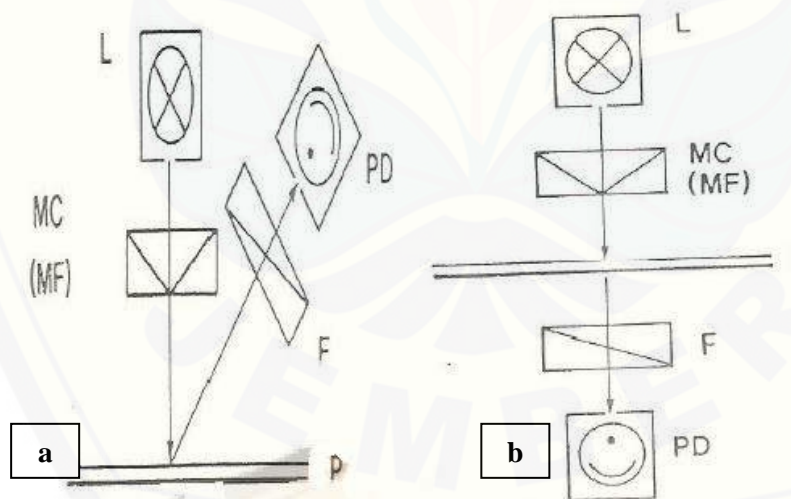
2.7 Densitometri

Densitometri adalah metode analisis instrumental berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan noda pada plat KLT. Radiasi elektromagnetik yang mengenai plat KLT akan diadsorbsi oleh analit, ditransmisi, atau diemisikan berupa fluoresensi dan fosforesensi (Sherma & Fried, 2003). Densitometri lebih dititikberatkan untuk analisis kuantitatif anali-analit dengan kadar yang sangat kecil yang perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu (Mulja & Suharman, 1995).

Metode densitometri digunakan untuk penetapan kadar suatu senyawa pada lempeng kromatografi, menggunakan instrumen *TLC scanner* atau biasa disebut densitometer, serta pengukuran dilakukan dengan cara mengukur serapan analit (cahaya yang diukur dapat berupa cahaya yang dipantulkan atau diteruskan),

pemadaman fluoresensi untuk lapisan yang mengandung bahan berfluoresensi analit atau hasil reaksi analit. *TLC scanner* berfungsi untuk mengukur tingkat kepekatan atau intensitas warna yang terdapat pada suatu permukaan (bidang datar) dan dilengkapi dengan spektrofotometer yang panjang gelombangnya dapat diatur dari 200-700 nm. Sinar yang dipantulkan mengalami hambatan pendukung lempeng dan keseragaman fase diam. Sinar yang dipantulkan dengan arah yang sudah pasti yaitu menuju bercak noda, sehingga dapat dipantau berapa jumlah sinar yang diserap oleh noda. Sinar ini sangat sensitif, maka untuk setiap senyawa perlu diketahui panjang gelombang maksimumnya (Mulja & Suharman, 1995).

Susunan optik *TLC scanner* tidak banyak berbeda dari spektrofotometer, tetapi pada *TLC scanner* digunakan alat khusus yaitu *reflection photomultiplier*, sebagai pengganti photomultiplier pada spektrofotometer yang dapat memperbesar tenaga beda potensial listrik sehingga mampu menggerakkan integrator (Mulja & Suharman, 1995). Ilustrasi model scanning densitometer dapat dilihat pada gambar 2.8.



Gambar 2.8 Ilustrasi model *scanning* (a) refleksi (b) transmisi. L = lamp, D= detektor, F = cut off filter (for fluorescence), P = plate, MF = Monochromatic filter, MC= Monokromator (Sherma *et. al.*, 1996)

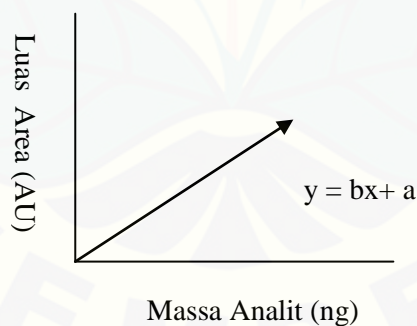
2.8 Validasi Metode

Validasi metode adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004).

2.8.1 Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita, 2004). Daerah linier (*linier range*) merupakan daerah (*range*) konsentrasi dimana sinyal yang dihasilkan memberikan respon berupa kurva kalibrasi linier yang berbanding lurus dengan konsentrasi analit (Basset *et al.*, 1989). Linieritas menggunakan minimal lima deret konsentrasi larutan standar untuk dijadikan kurva. kemiringan (*slope*) dan intersep juga dicantumkan dalam kurva (ICH, 2006). Secara sistematis linieritas ditunjukkan dengan persamaan garis sebagai berikut:

$$y = bx + a$$



Gambar 2.9 Kurva kalibrasi daerah linier

dimana:

b = *slope* kurva kalibrasi

a = intersep atau perpotongan sumbu y (Caulcutt & Boddy, 1989).

Nilai koefisien korelasi dapat dicari melalui pembuatan kurva kalibrasi menggunakan perangkat lunak komputer, sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Ermer & Miller, 2004).

2.8.2 Batas Deteksi (*Limit of Detection/ LOD*)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit yang masih dapat dideteksi memberikan respon dibandingkan blanko. Semakin kecil konsentrasi yang dideteksi, semakin baik karakteristik biosensor yang digunakan (Ermer & Miller, 2004). Batas deteksi merupakan parameter uji batas yang dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi dengan rumus:

$$LOD = \frac{3SD}{b}$$

dimana:

b = *slope* kurva kalibrasi

SD = simpangan baku blanko/ SD intersep y pada garis regresi (Gandjar, 2012).

2.8.3 Batas Kuantitasi (*Limit of Quantitation/ LOQ*)

Batas kuantitasi merupakan parameter dari analisis renik dan dapat diartikan sebagai kuantitasi terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004). Batas kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi dengan rumus:

$$LOD = \frac{10 SD}{b}$$

dimana:

b = *slope* kurva kalibrasi

SD = simpangan baku blanko/ SD intersep y pada garis regresi (Gandjar, 2012).

2.8.4 Kecermatan (*Accuracy*)

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). Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{m_f - m_a}{m_a^*} \times 100\%$$

dimana:

m_f = massa total nikotin dalam sampel + larutan standar hasil pengukuran

m_a = massa nikotin yang didapatkan

m_a^* = massa nikotin yang ditambahkan (Ermer & Miller, 2004).

2.8.5 Keseksamaan (*Precision*)

Keseksamaan atau presisi adalah ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik (Gandjar, 2012). Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku dan simpangan baku relatif. Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau reproduibilitas (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan jika diulang berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama pula dan dalam interval waktu yang pendek (Harmita, 2004).

Keterulangan sensor terhadap analit dapat digolongkan baik bila kesesuaian respon tersebut antara satu respon dengan respon lainnya yang dinyatakan dengan Simpangan Baku Relatif (SBR) $\leq 5,3$ (Huber, 2007). Pada pengujian nilai RSD antara 1-2% biasanya dipersyaratkan untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah yang banyak, sedangkan untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit RSD berkisar antara 5-15%. Semakin kecil nilai RSD dari serangkaian pengukuran maka metode yang digunakan semakin tepat (Gandjar, 2012). Keseksamaan dapat dihitung dengan cara sebagai berikut:

1. Simpangan Baku (SB) atau Standar Deviasi (SD)

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

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

2. Simpangan Baku Relatif (SBR)

$$SBR = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

dimana:

x_i = hasil pengujian

\bar{x} = nilai rata-rata

n = jumlah pengukuran (Ermer & Miller, 2004).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Oktober 2015 sampai April 2016. Persiapan sampel dan analisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Proses pemindaian dengan TLC *Scanner* dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini terdiri atas: pisau *stainless steel*, alat penggiling (*grinder*), corong pisah, pipet tetes, pipet Mohr 1 mL, 5 mL, dan 10 mL, pipet mikro (1-10 μ L), gelas ukur 50 mL, labu ukur 10 mL, 25 mL, dan 50 mL, erlenmeyer 100 mL dan 125 mL, gelas piala 50 mL dan 100 mL, pengaduk kaca, corong gelas, botol gelas kecil, bejana (*chamber* ukuran 10 x 10 x 5) cm, *hair dryer*, set alat soxhletasi, pH meter, *rotary evaporator*, neraca analitik Ohaus, lampu ultraviolet, desikator, dan *CAMAG TLC Scanner* (Shimadzu Dual Wavelength *Chromato Scanner* CS 930).

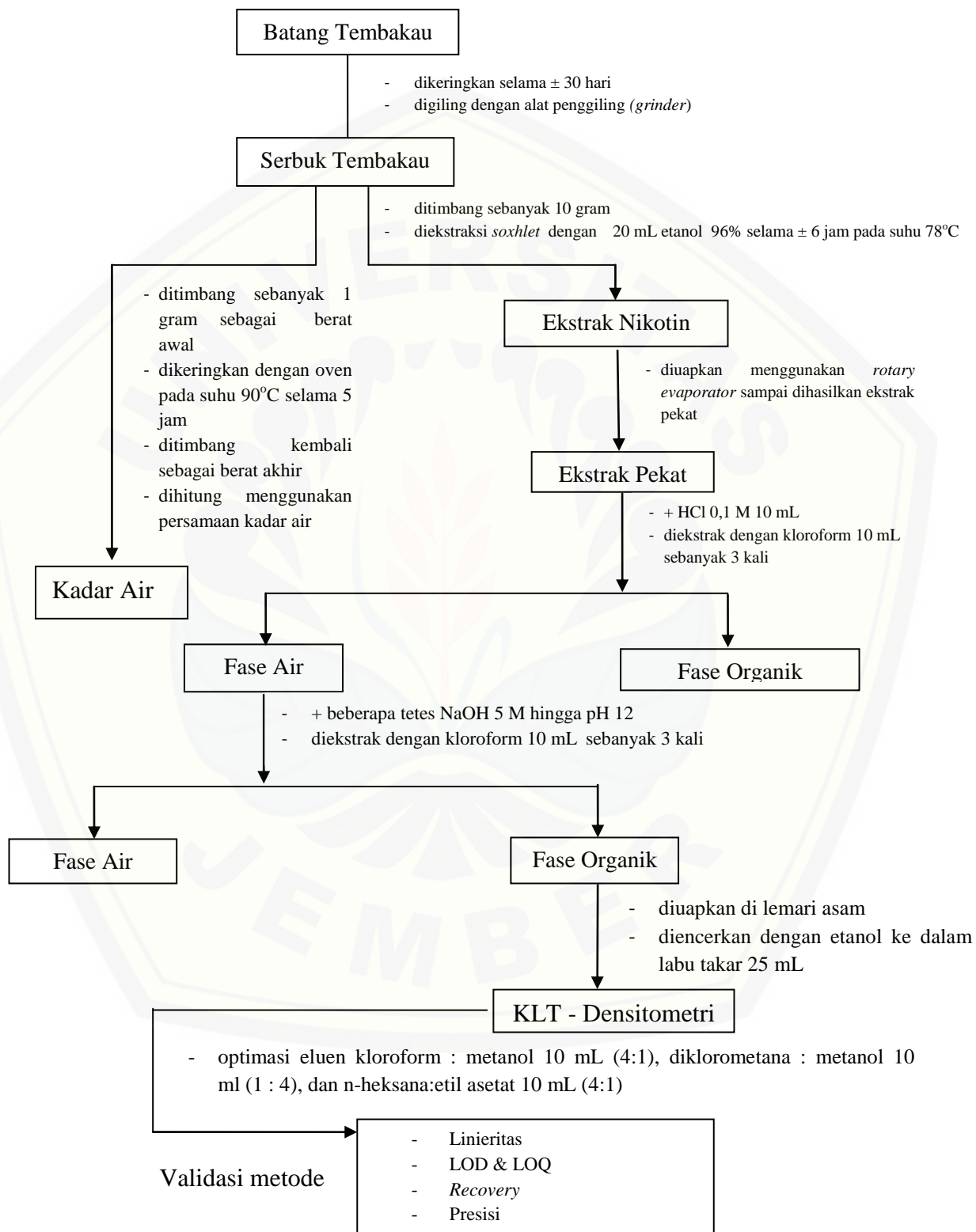
3.2.2 Bahan

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini terdiri atas:

Sampel: Batang tembakau dari Balai Penelitian Tembakau PTPN X yang dipanen pada bulan Juli 2015.

Bahan Kimia: standar nikotin p.a (98%), kloroform p.a dari Merck, metanol p.a dari Merck, etil asetat p.a dari Merck, etanol 96% p.a dari Merck, diklorometana p.a dari Merck, n-heksana p.a dari Merck, HCl dari Merck, NaOH dari Merck, akuades, aluminium foil, reagen *Dragendorff* dan plat KLT Silika Gel F₂₅₄

3.3 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Larutan Induk Nikotin 1000 ppm

Larutan baku nikotin dipipet sebanyak 25 μ L ke dalam labu ukur 25 mL, diencerkan dengan etanol hingga tanda batas dan dihomogenkan untuk memperoleh konsentrasi nikotin 1000 ppm.

3.4.2 Preparasi Sampel

Tembakau diambil batangnya $\frac{1}{2}$ bagian dari batang atas, lalu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Batang tembakau dipotong kecil - kecil dan dikeringkan dengan cara dijemur di panas matahari selama \pm 30 hari. Batang tembakau yang telah dikeringkan di giling dengan alat penggiling (*grinder*) hingga menjadi serbuk tembakau.

3.4.3 Penentuan Kadar Air

Kadar air diperlukan untuk mengetahui kandungan air yang terdapat pada batang tembakau. Serbuk batang tembakau ditimbang sebanyak \pm 1 gram sebagai massa awal, setelah itu sampel dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 90°C selama 5 jam sebagai massa akhir dan ditimbang (Li *et al.*, 2011). Kadar air pada bahan dapat diketahui dengan menggunakan rumus :

$$Kadar\ Air = \frac{massa\ awal - massa\ akhir}{massa\ awal} \times 100\%$$

3.4.4 Ekstraksi Nikotin

Ekstraksi nikotin dilakukan dengan proses soxhletasi kemudian dilanjutkan dengan evaporasi. Bubuk tembakau sebanyak \pm 10 gram dimasukkan ke dalam tabung soxhlet yang dibungkus dengan kertas saring, labu soxhlet diisi dengan pelarut etanol 96 % sebanyak 100 ml dan tambahkan beberapa batu didih selama proses soxhletasi yang dilengkapi kondensor sebagai pendingin. Proses soxhletasi dilakukan dengan pemanasan selama \pm 6 jam pada suhu 78°C. Ekstrak yang diperoleh

selanjutnya diuapkan untuk menghilangkan pelarut menggunakan alat *rotary evaporator* sampai dihasilkan larutan yang pekat atau filtrat tinggal 5 % dari volume semula (Drastinawati & Irianty, 2013). Ekstrak pekat batang tembakau dilarutkan dengan HCl 1 M sebanyak 10 ml dengan bantuan ultrasonikator sampai homogen selama 60 menit, kemudian diekstraksi menggunakan kloroform 10 mL sebanyak 3 kali. Lapisan bawah dikeluarkan, sedangkan lapisan atas dibasakan lagi dengan menambahkan NaOH 5 M hingga pH sekitar 12, kemudian diekstraksi lagi dengan kloroform 10 mL sebanyak 3 kali. Fase bawah (kloroform) diambil dan diuapkan dengan *rotary evaporator*, selanjutnya diencerkan dengan etanol di dalam labu takar 5 mL hingga tanda batas (Chairio, 2011).

3.4.5 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum (*Scanning*)

Larutan standar nikotin 5 dan 10 ppm dimasukkan ke dalam kuvet dan etanol digunakan sebagai blangko. Langkah selanjutnya dilakukan *scanning* menggunakan Spektrofotometer UV pada rentang panjang gelombang 200-300 nm dengan interval 1 nm.

3.4.6 Aktivasi plat KLT silika Gel F₂₅₄

Plat KLT silika gel F₂₅₄ yang sudah dipotong sesuai ukuran yang dibutuhkan (10 x 10) cm dielusi menggunakan eluen yang akan digunakan dan telah dijenuhkan sampai terelusi seluruhnya. Plat diangkat dan diangin-anginkan sampai kering (\pm 15 menit). Plat KLT siap untuk dianalisis.

3.4.7 Optimasi Komposisi Eluen

Larutan standar nikotin 100 ppm ditotolkan sebanyak 20 μ L (1 μ L untuk sekali totolan) pada plat KLT Silika gel F₂₅₄ yang sudah diaktivasi. Penotolan dilakukan secara bertahap dengan proses pengeringan menggunakan *hair dryer* antar totolan. Penotolan dilakukan pada jarak 1 cm dari batas bawah plat, 1 cm dari samping kanan dan kiri plat, dan jarak, dan jarak masing-masing titik adalah 1 cm. Plat KLT dielusi

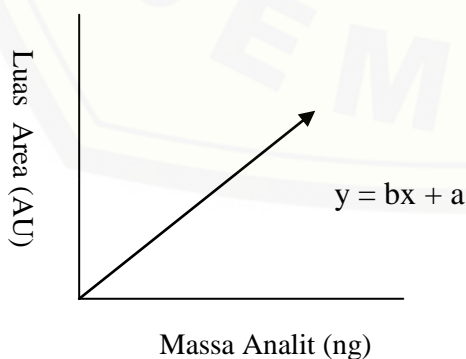
menggunakan campuran eluen kloroform : metanol sebanyak (4:1 ; 2:3 ; 1:1) 10 mL, metanol : diklorometana (4:1 ; 2:3 ; 1:1) 10 ml, dan n-heksana : etil asetat (4:1 ; 2:3) 10 mL dalam bejana atau chamber dengan ukuran (10 x 10 x 5) cm. Eluen didiamkan hingga berjalan 8,5 cm dari batas bawah plat. Plat diangkat dan diangin-anginkan. Plat disinari menggunakan lampu UV untuk melihat spot yang dihasilkan. Noda hasil pengukuran diukur Rf-nya dan dipilih komposisi eluen dengan nilai Rf antara 0,2-0,8 bentuk spot bagus, serta nilai standar deviasi yang dihasilkan kecil. Optimasi diulang sebanyak 3 kali untuk setiap variasi perbandingan eluen. Setelah diketahui campuran eluen yang optimum maka di uji dengan sampel dan di ukur dengan densitometer serta disemprot dengan reagen *Dragendorff* untuk visualisasi spot secara kualitatif.

3.4.8 Validasi Metode

3.4.8.1 Uji Linieritas

Uji linieritas ditentukan dengan cara menyiapkan 10 larutan standar nikotin dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm. Masing – masing ditotolkan sebanyak 20 μ L (1 μ L untuk sekali totalan) pada plat KLT Silika Gel F₂₅₄ yang sudah di aktivasi. Selanjutnya diuji menggunakan metode KLT – Densitometri dengan eluen yang sudah di optimasi (Harmita, 2004).

Hasil Pengukuran yaitu luas daerah dan massa larutan standar nikotin yang dimasukkan (plot) ke dalam sebuah kurva penentuan daerah linier dengan persamaan $y = bx + a$ (Ermer & Miller, 2004).



3.4.8.2. Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantitasi (LOQ)

Limit deteksi dan limit kuantitasi dapat dihitung dengan menggunakan persamaan linier yang diperoleh pada uji linieritas. Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ) dihitung menggunakan persamaan :

$$LOD = \frac{3SD}{b} \qquad LOQ = \frac{10SD}{b}$$

dimana:

b = slope kurva kalibrasi daerah linier

SD = standar deviasi blanko/ SD intersep y pada garis regresi kurva kalibrasi (Gandjar, 2012).

3.4.8.3 Kecermatan (*Accuracy*)

Larutan standar nikotin dengan konsentrasi 70, 80, dan 90 ppm ditambahkan masing-masing sebanyak 2 mL ke dalam 2 mL sampel sebelum preparasi sampel dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Ekstrak sampel yang telah ditambahkan larutan standar nikotin ditotolkan sebanyak 20 μ L (1 μ L untuk sekali totolan) pada plat Silika gel F₂₅₄ yang sudah diaktivasi. Selanjutnya diuji menggunakan metode KLT – Densitometri dengan eluen yang sudah di optimasi sehingga dihasilkan massa total sampel yang diperoleh dari pengukuran (m_f). Pengukuran menggunakan metode KLT – Densitometri dengan eluen yang sudah di optimasi juga dilakukan dengan sampel yang sudah di ekstraksi tanpa penambahan larutan standar sehingga dihasilkan massa sampel yang sebenarnya (m_a) (AOAC, 2002). kecermatan dapat ditetapkan dengan persamaan:

$$\% \text{ recovery} = \frac{m_f - m_a}{m^*a} \times 100\%$$

dimana:

m_f = massa total standar nikotin + sampel dari hasil pengukuran

m_a = massa sampel yang didapatkan

m^*a = massa nikotin yang ditambahkan (Ermer & Miller, 2004).

3.4.8.4 Keseksamaan (*Precision*)

Larutan standar nikotin dengan konsentrasi 50, 70 dan 100 ppm diuji menggunakan metode KLT – Densitometri dengan eluen yang sudah di optimasi. Pengulangan dilakukan 6 kali untuk masing-masing larutan nikotin. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku dan simpangan baku relatif dengan persamaan sebagai berikut:

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

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$SBR = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

dimana:

x_i = hasil pengujian

\bar{x} = nilai rata-rata

n = jumlah pengukuran (Ermer & Miller, 2004).

3.4.9 Analisis Nikotin Pada Batang Tembakau

Larutan standar nikotin 100 ppm dan ekstrak batang tembakau masing-masing ditotolkan 20 μ L (1 μ L untuk sekali totalan) pada plat KLT Silika gel F₂₅₄ yang sudah diaktivasi. Penotolan dilakukan secara bertahap dengan proses pengeringan menggunakan *hair dryer* antar totalan. Penotolan dilakukan pada jarak 1 cm dari batas bawah plat, 1 cm dari samping kanan dan kiri plat, dan jarak masing-masing titik adalah 1 cm. Plat KLT dielusi menggunakan eluen yang sudah di optimasi dalam bejana. Eluen didiamkan hingga berjalan 9,5 cm dari batas bawah plat. Plat diangkat dan diangin-anginkan. Pemindaian dengan TLC *Scanner* dilakukan pada panjang gelombang yang diperoleh dari hasil *scanning* pengukuran panjang gelombang maksimum nikotin menggunakan spektrofotometer UV.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari pembahasan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Optimasi komposisi eluen yang menghasilkan pemisahan yang baik dalam analisis kadar nikotin dalam batang tembakau menggunakan metode KLT-Densitometri adalah metanol : kloroform dengan perbandingan 1 : 1;
2. Metode KLT-Densitometri untuk analisis kadar nikotin dalam batang tembakau dinyatakan valid berdasarkan hasil pengujian terhadap parameter validasi metode yaitu linieritas dengan nilai $r = 0,998$; LOD dan LOQ dengan nilai 66,72 ng dan 222,4 ng; presisi dengan nilai 3-6,28 %; dan akurasi dengan nilai 80 % - 100 %;
3. Kadar nikotin dalam batang tembakau adalah $0,015 \pm 0,001$ %.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan berdasarkan hasil penelitian adalah:

1. Metode KLT-Densitometri perlu diterapkan dan dikembangkan lagi untuk analisis senyawa lain selain nikotin;
2. Sebaiknya dilakukan perlakuan seperti pemurnian dan isolasi agar yang didapatkan hanya senyawa nikotin.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A dan Soedarmanto. 1982. *Budidaya Tembakau*. Jakarta: CV Yasaguna.
- Amin, F., Fahmi, M.S., Chalik, A., Cahyani R.D., dan Kurniawan, T. 2008. "Ekstraksi Nikotin Dari Limbah tangkai Tembakau dan Pemanfaatannya Sebagai Insektisida Tanaman Kehutanan". PKM Penelitian. Tidak di Publikasikan. Bogor: IPB.
- AOAC. 2002. *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*. <http://www.aoac.org/OfficialMethods/slvguidlines.pdf>.
- Baehaki. 1993. *Berbagai Hama Serangga Tanaman Padi*. Bandung : Angkasa.
- Basset, Jeffer, Mendham, and Denney. 1989. *Vogel's Textbook of Quntitive Chemical Analysis. Fifth Edition*. New York: John Willey & Sons, Inc.
- Cahyono, B. 1998. *Tembakau: Budidaya dan Analisis Tani*. Yogyakarta: Kanisius.
- Calcutt, J and Boddy, R. 1989. *Statistic for Analytical Chemistry*. London: Chapman and Hall.
- Chairio, N. 2011. "Optimasi Metode KLT-Densitometri Pada Penetapan Kadar Nikotin Dalam Fraksi Kkloroform Ekstrak Etanolik Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.)". Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Drastinawati, dan Irianty, S.R. 2013. Pemanfaatan Ekstrak Nikotin Limbah Puntung Rokok Sebagai Inhibitor Korosi. *Jurnal Teknobiologi*. Vol. IV No.2: 91-97
- Ermer, J and Miller, J. H. McB. 2004. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. Jerman: Willey-VCH Verlag GmbH & co. KgaA.

- Ernesta, A. 2011. "Optimasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Fase Terbalik Pada penetapan Kadar Nikotin Dalam Ekstrak Etanolik daun Tembakau". Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Furniss, B.S., A.J. Hannaford, V. Rogers, P.W.G. Smith and A.R. Tatchell. 1980. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (Fourth Ed.)*. New York: The English Language Book Society and Longman. p. 100 -136.
- Gandjar, I.G dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gritter, R. J., Bobbit, J.M. dan Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Edisi II, 107. Bandung: Penerbit ITB.
- Harborne, J. B. 1996. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Terbitan Kedua. Bandung: ITB.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. ISSN 1693-9883. Vol. 1(3): 117-135.
- Hilmi, A. 2013. Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis Densitometri Untuk Penetapan Kadar Kolkisin Dalam Infus Daun Kembang Sungsang (*Gloriosa Superba Linn.*). *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*. Vol. 2 No. 2.
- Huber, L. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Second Edition*. New York: Informa Healthcare USA, Inc.
- IAEA. 2005. *Validation of Thin Layer Chromatographic Methods for Pesticide Residue Analysis*. Austria: IAEA.
- ICH. 2006. *Validation of Analytical Procedure. Text and Methodology* . London: European Medicines Agency.
- Kunle., Folashade, O., Egharevba, O., Henry, A., and Ochugu, P. 2012. Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of*

Biodiversity and Conservation Vol. 4(3), pp. 101-112. ISSN 2141-243X, p.101-112.

Khopkar. 1990. *Concepts of Analytical Chemistry*, diterjemahkan oleh Sapto Raharjo. Jakarta: UI Press.

Li, X.G., Jian, S.W., Ma, B.G., and Tan, H.B. 2011. Thermogravimetric Investigation on Co-Combustion Characteristics of Tobacco Residue and High Ash Anthracite Coal. *Bioresour. Technol.* 102, 9783-9787.

Liu, Y., Dong, J., Liu, G., Yang, H., Liu, W., Wang, L., Kong, C., Zheng, D., Yang, J., Deng, L., and Wang, S. 2015. Co-Digestion of Tobacco Waste With Different Biocultural Biomass Feedstocks and The Inhibition of Tobacco Viruses by Anaerobic Digestion. *Bioresour. Technol.* 189, 210–216.

Matnawi, H. 1997. *Budidaya Tembakau Bawah Naungan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

Mulja & Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: UNAIR Press.

Mursyidi, A. 1990. *Analisis Metabolit Sekunder*. UGM: Yogyakarta.

Piotrowska-Cyplik, A., Olejnik, A., Cyplik, P., Dach, J., Czarnecki, Z., 2009. The Kinetics of Nicotine Degradation, Enzyme Activities And Genotoxic Potential In The Characterization Of Tobacco Waste Composting. *Bioresour. Technol.* 100, 5037–5044.

Popl, M., Fahrinch, J., and Tatar, V. *Chromatographic Analysis of Alkaloids*. Marcel Dekker Inc., New York and Bassel, pp. 55.

Riyanto. 2014. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai Dengan ISO/ IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*. Yogyakarta : Deepublish.

Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi Keenam. Terjemahan Kokasih Padmawinata. Bandung : FMIPA ITB.

- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Bandung: ITB.
- Sherma, J. and Fried, B. 2003. *Handbook of TLC Chromatography*. Third Edition. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Suryanto, A. 2012. *Tembakau Cerutu Na Oogst Unggulan Pertanian Jember* [serial Online]. <http://www.cerutujember.com>.
- Tobing, R. 1989. *Kimia Bahan Alam*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Proyek Pengembangan Lembaga Pendidikan Tenaga Kependidikan.
- Wolff, M. 1994. *Asas – Asas Kimia Medisinal*. Edisi Keempat. Yogyakarta: Gajah Mada Press.
- Wu, C., Siems, W.F., Hill, H.H., Junior, and Hannan, R.M. 1998. Analytical Determination Of Nicotine In Tobacco By Supercritical Fluid Chromatography–Ion Mobility Detection. *Journal of Chromatography*. 811, 157-181.
- Yuni, S.E. 2006. "Identifikasi Nikotin Dari Daun *Tembakau (Nicotiana Tabaccum L.)* Kering Dan Uji Efektivitas Ekstrak Daun Tembakau Sebagai Insektisida Penggerek Batang Padi (*Scirpophaga Innonata*)". Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Semarang: Jurusan Kimia FMIPA UNNES.

LAMPIRAN A. PROSEDUR PEMBUATAN LARUTAN STANDAR NIKOTIN

A.1 Pembuatan Larutan Standar Nikotin 100 ppm

Larutan induk nikotin 1000 ppm dipipet menggunakan pipet Mohr 1 mL sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Etanol p.a ditambahkan sampai tanda batas.

A.2 Pembuatan Larutan Standar Nikotin 90 ppm

Larutan induk nikotin 1000 ppm dipipet menggunakan pipet Mohr 1 mL sebanyak 0,9 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Etanol p.a ditambahkan sampai tanda batas.

A.3 Pembuatan Larutan Standar Nikotin 80 ppm

Larutan induk nikotin 1000 ppm dipipet menggunakan pipet Mohr 1 mL sebanyak 0,8 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Etanol p.a ditambahkan sampai tanda batas.

A.4 Pembuatan Larutan Standar Nikotin 70 ppm

Larutan induk nikotin 1000 ppm dipipet menggunakan pipet Mohr 1 mL sebanyak 0,7 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Etanol p.a ditambahkan sampai tanda batas.

A.5 Pembuatan Larutan Standar Nikotin 60 ppm

Larutan induk nikotin 1000 ppm dipipet menggunakan pipet Mohr 1 mL sebanyak 0,6 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Etanol p.a ditambahkan sampai tanda batas.

A.6 Pembuatan Larutan Standar Nikotin 50 ppm

Larutan induk nikotin 1000 ppm dipipet menggunakan pipet Mohr 1 mL sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Etanol p.a ditambahkan sampai tanda batas.

A.7 Pembuatan Larutan Standar Nikotin 40 ppm

Larutan induk nikotin 1000 ppm dipipet menggunakan pipet Mohr 1 mL sebanyak 0,4 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Etanol p.a ditambahkan sampai tanda batas.

A.8 Pembuatan Larutan Standar Nikotin 30 ppm

Larutan induk nikotin 1000 ppm dipipet menggunakan pipet Mohr 1 mL sebanyak 0,3 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Etanol p.a ditambahkan sampai tanda batas.

A.9 Pembuatan Larutan Standar Nikotin 20 ppm

Larutan induk nikotin 1000 ppm dipipet menggunakan pipet Mohr 1 mL sebanyak 0,2 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Etanol p.a ditambahkan sampai tanda batas.

A.10 Pembuatan Larutan Standar Nikotin 10 ppm

Larutan induk nikotin 1000 ppm dipipet menggunakan pipet Mohr 1 mL sebanyak 0,1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Etanol p.a ditambahkan sampai tanda batas.

**LAMPIRAN B. DATA PENENTUAN PANJANG GELOMBANG
MAKSIMUM (SCANNING)**

Panjang Gelombang	Absorbansi	Panjang Gelombang	Absorbansi
300.0	0.008	275.0	0.041
299.0	0.008	274.0	0.050
298.0	0.009	273.0	0.061
297.0	0.009	272.0	0.076
296.0	0.010	271.0	0.091
295.0	0.010	270.0	0.105
294.0	0.010	269.0	0.116
293.0	0.011	268.0	0.121
292.0	0.011	267.0	0.123
291.0	0.011	266.0	0.127
290.0	0.012	265.0	0.136
289.0	0.012	264.0	0.148
288.0	0.012	263.0	0.157
287.0	0.013	262.0*	0.160*
286.0	0.013	261.0	0.158
285.0	0.014	260.0	0.154
284.0	0.015	259.0	0.151
283.0	0.016	258.0	0.151
282.0	0.017	257.0	0.152
281.0	0.019	256.0	0.151
280.0	0.020	255.0	0.148
279.0	0.022	254.0	0.143
278.0	0.025	253.0	0.136
277.0	0.029	252.0	0.131
276.0	0.035	251.0	0.128

LAMPIRAN C. DATA OPTIMASI KOMPOSISI ELUEN

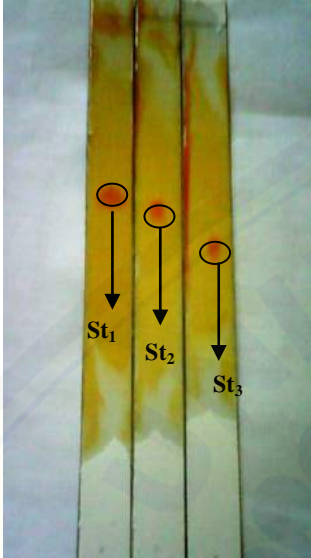
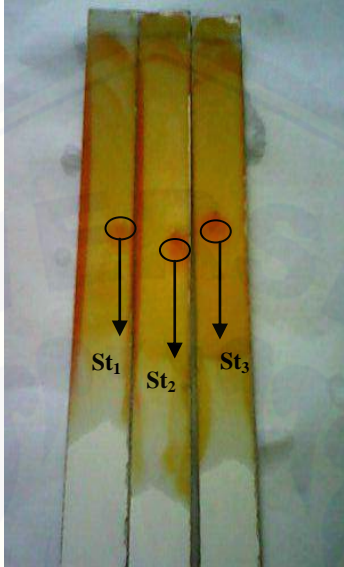
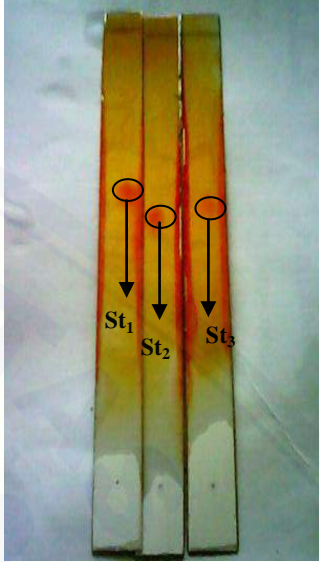
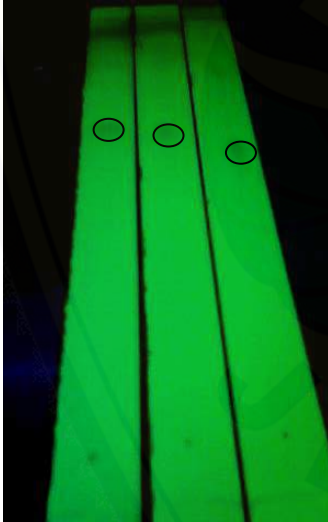
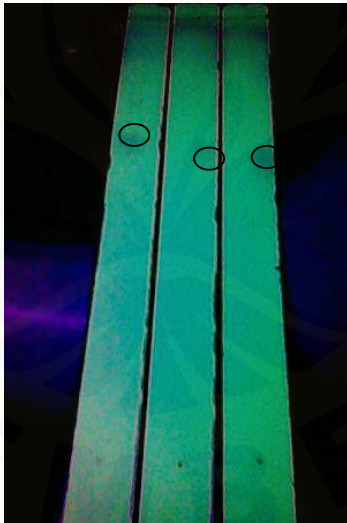
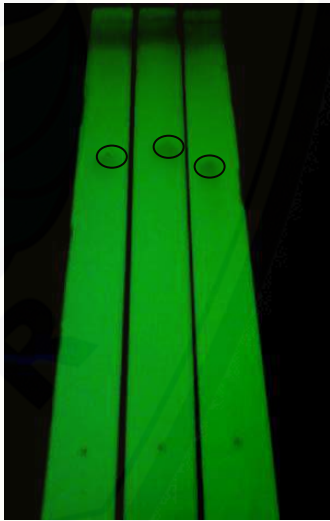
C.1 Hasil Perhitungan Rf dan Standar Deviasi Noda pada KLT

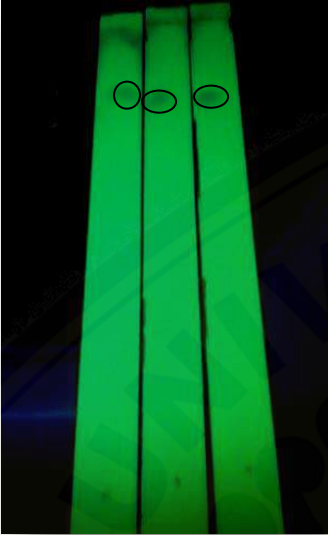

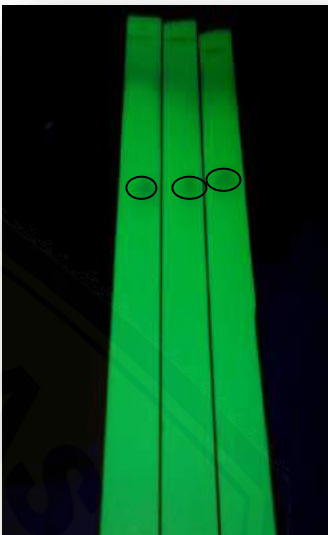
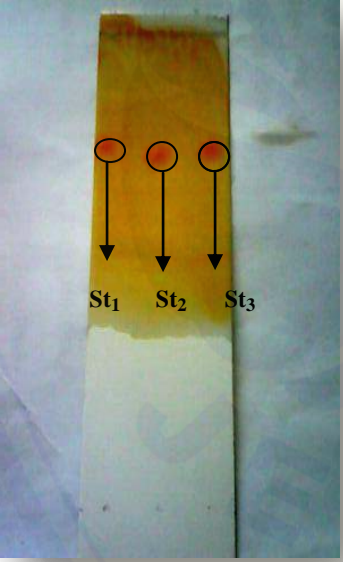
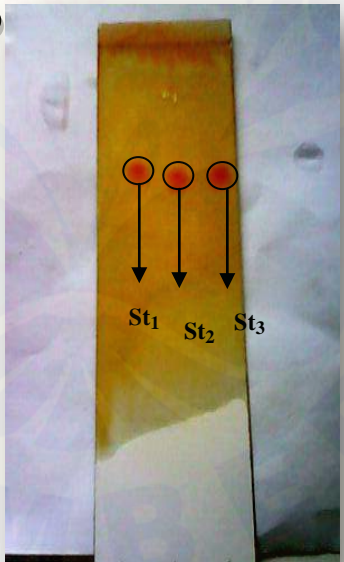
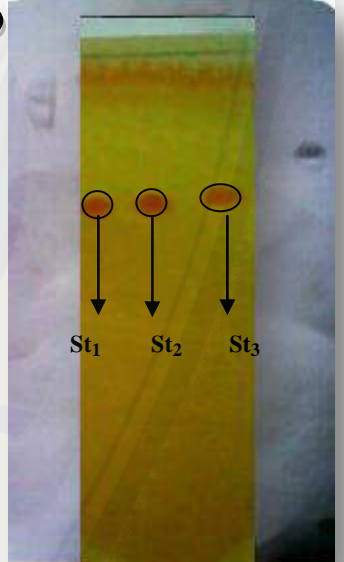
Komposisi Eluen	Rf ₁	Rf ₂	Rf ₃	Rf rata-rata	Standar Deviasi
Diklorometana : Metanol					
1 : 4	0,5882	0,5647	0,6117	0,5882	0,0235
2 : 3	0,6471	0,6235	0,6117	0,6274	0,0180
1 : 1	0,5765	0,6235	0,6352	0,6117	0,0311
Metanol : Kloroform					
1 : 4	0,7294	0,7412	0,7412	0,7372	0,0068
2 : 3	0,6941	0,6941	0,6824	0,6902	0,0068
1 : 1	0,6471	0,6471	0,6588	0,6510	0,0068
Etil Asetat : n-Heksana					
1 : 4	0,0588	0,0353	0,0353	0,0431	0,0135
2 : 3	0,0588	0,0353	0,0588	0,0509	0,0136

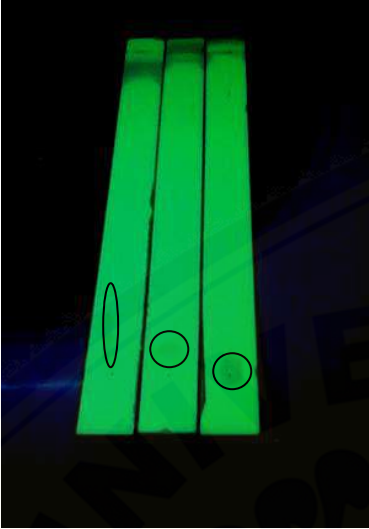
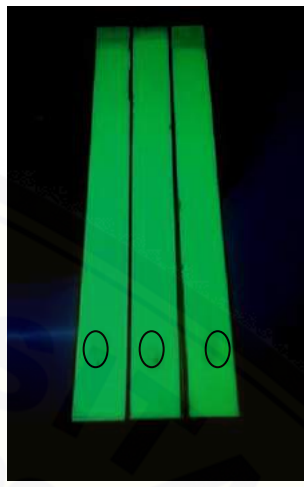
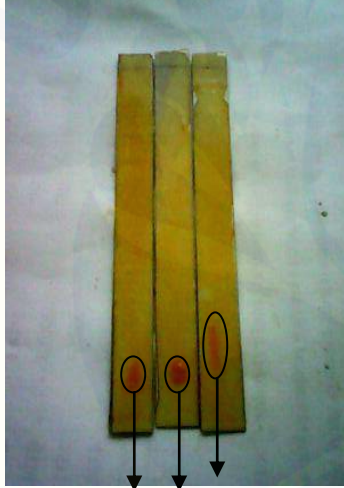
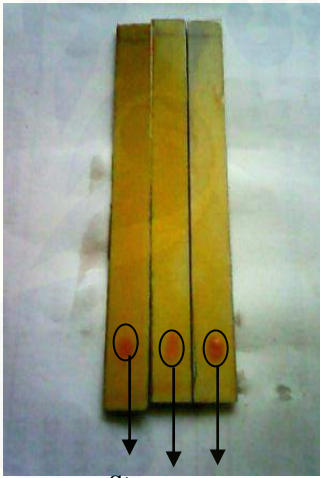
C2. Hasil Optimasi Larutan Sampel Dengan Eluen Metanol : Kloroform

Komposisi Eluen	Rf ₁	Rf ₂	Rf ₃	Rf rata-rata	Standar Deviasi
Metanol : Kloroform					
1 : 4	0,7294	0,7412	0,7412	0,7372	0,0068
Sampel	0,7200	0,7100	0,7100	0,7133	0,0068
2 : 3	0,6941	0,6941	0,6824	0,6902	0,0068
Sampel	0,6600	0,6700	0,6900	0,6733	0,0152
1 : 1	0,6471	0,6471	0,6588	0,6510*	0,0068*
Sampel	0,6400	0,6400	0,6500	0,6433*	0,0068*

C.3 Kromatogram Hasil Analisis Menggunakan KLT




		
		
<p>Diklorometana : Metanol 1 : 4</p>	<p>Diklorometana : Metanol 2 : 3</p>	<p>Diklorometana : Metanol 1 : 1</p>

		
		
<p>Metanol : Kloroform 1 : 4</p>	<p>Metanol : Kloroform 2 : 3</p>	<p>Metanol : Kloroform 1 : 1</p>

	
 <p style="text-align: center;">St₁ St₂ St₃</p>	 <p style="text-align: center;">St₁ St₂ St₃</p>
<p style="text-align: center;">Etil Asetat : n-Heksana 1 : 4</p>	<p style="text-align: center;">Etil Asetat : n-Heksana 2 : 3</p>

Keterangan : ● = Dengan Reagen *Dragendorff*
● = Dengan Sinar UV
St = Standar nikotin

C.4 Hasil Kromatogram Sampel Dengan Eluen Metanol : Kloroform

		
Metanol : Kloroform 1 : 4	Metanol : Kloroform 2 : 3	Metanol : Kloroform 1 : 1

Keterangan : St = Standar nikotin

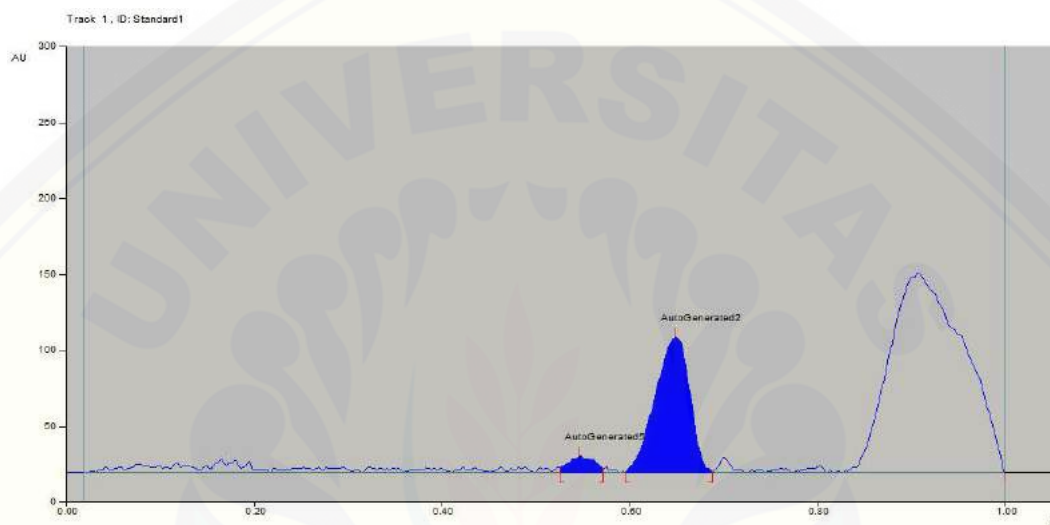
S = Sampel

C.5 Densitogram Standar Dengan Eluen Metanol : Kloroform

Metanol : Kloroform = 1 : 4

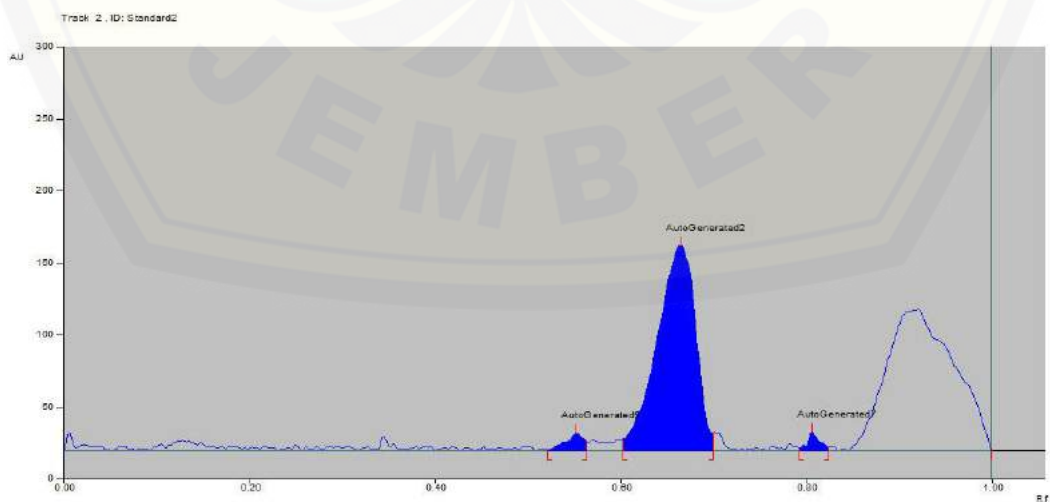
Pengulangan 1

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	0.9 AU	0.72 Rf	140.0 AU	100.00 %	0.74 Rf	8.1 AU	3595.4 AU	100.00 %	AutoGenerated2



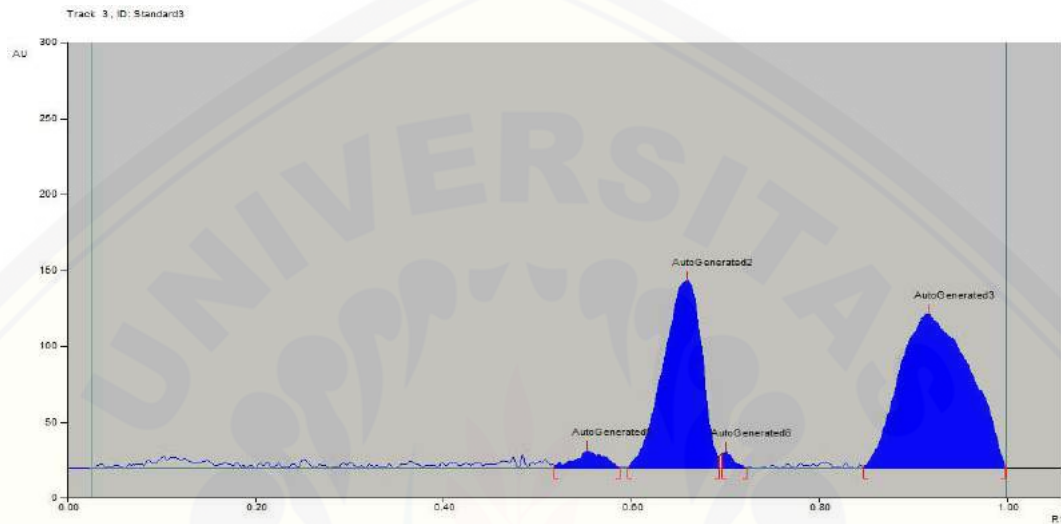
Pengulangan 2

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	0.9 AU	0.74 Rf	140.0 AU	100.00 %	0.76 Rf	8.1 AU	5077.7 AU	100.00 %	AutoGenerated2



Pengulangan 3

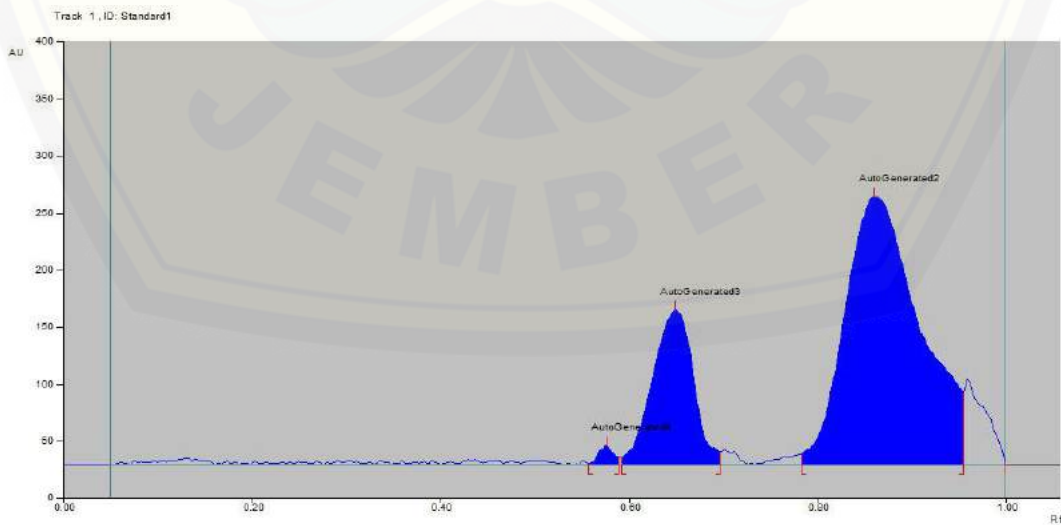
Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	0.9 AU	0.74 Rf	140.0 AU	100.00 %	0.76 Rf	8.1 AU	4849.2 AU	100.00 %	AutoGenerated2



Metanol : Kloroform = 2 : 3

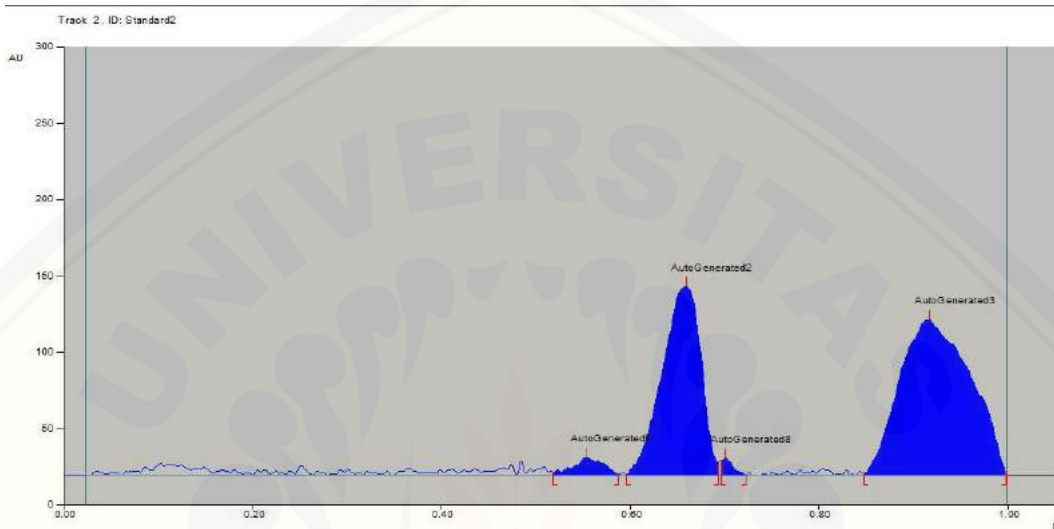
Pengulangan 1

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	0.9 AU	0.69 Rf	140.0 AU	100.00 %	0.70 Rf	8.1 AU	3424.5 AU	100.00 %	AutoGenerated2



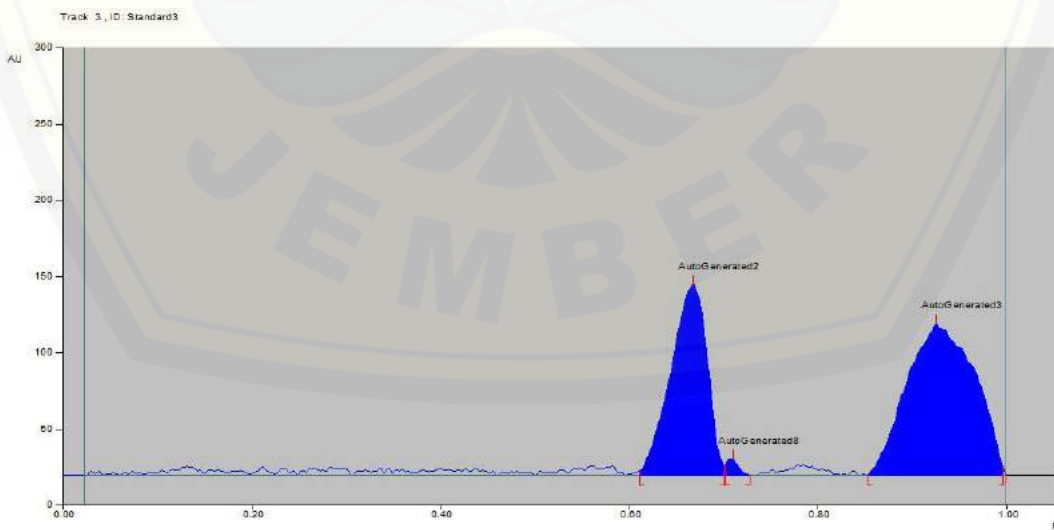
Pengulangan 2

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	0.9 AU	0.69 Rf	140.0 AU	100.00 %	0.70 Rf	8.1 AU	3595.4 AU	100.00 %	AutoGenerated2



Pengulangan 3

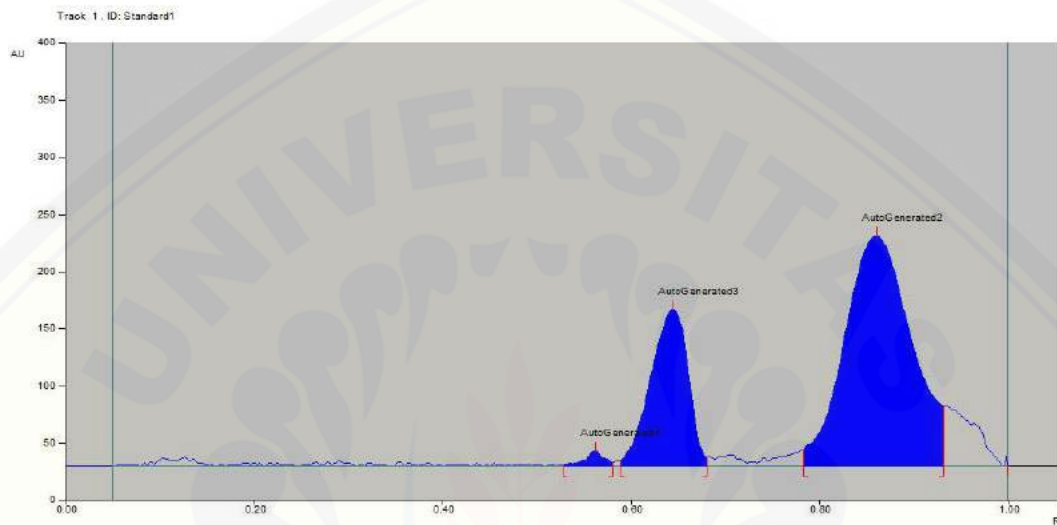
Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	0.9 AU	0.68 Rf	140.0 AU	100.00 %	0.70 Rf	8.1 AU	3595.4 AU	100.00 %	AutoGenerated2



Metanol : Kloroform = 1 : 1

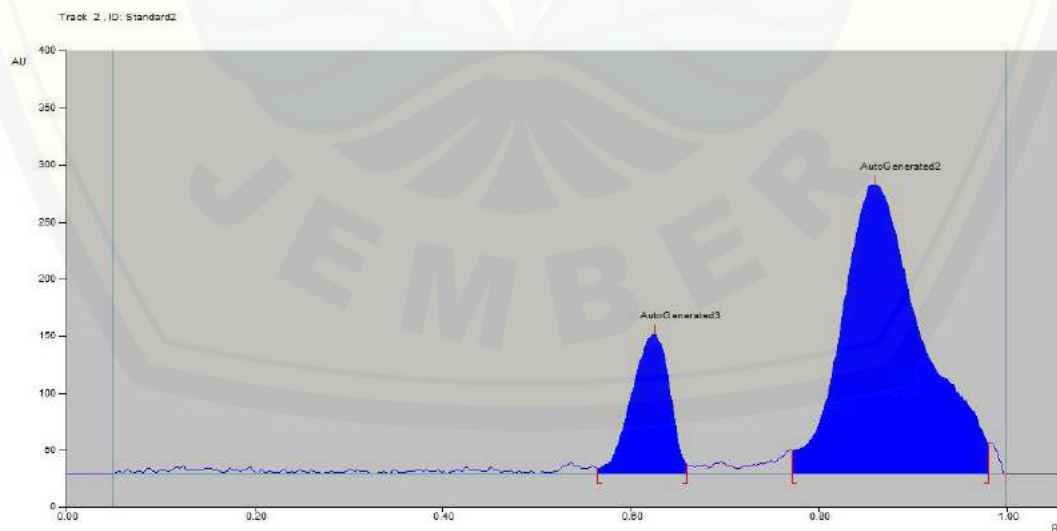
Pengulangan 1

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	2.0 AU	0.65 Rf	107.5 AU	100.00 %	0.69 Rf	2.0 AU	3709.5 AU	100.00 %	AutoGenerated3



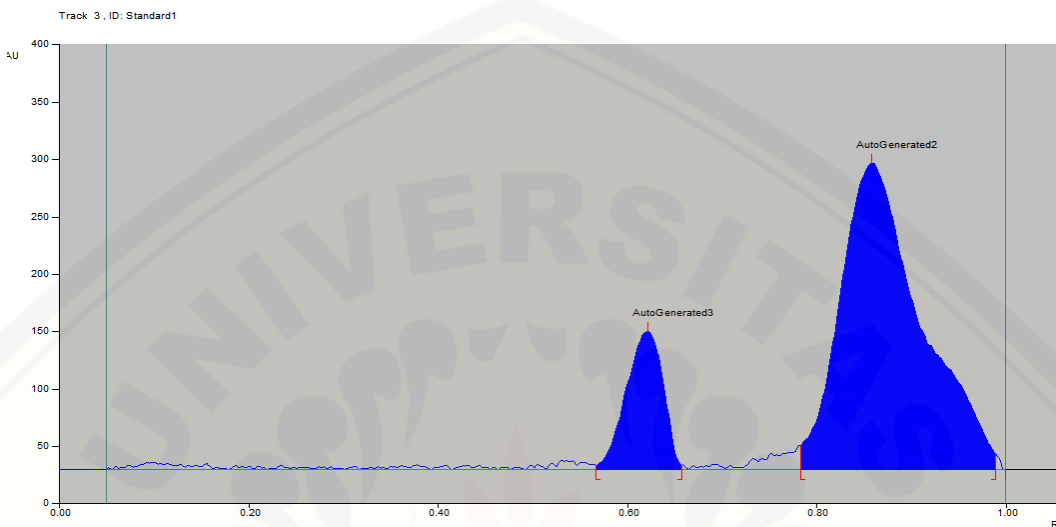
Pengulangan 2

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.58 Rf	0.2 AU	0.64 Rf	92.4 AU	100.00 %	0.67 Rf	0.4 AU	3424.5 AU	100.00 %	AutoGenerated3



Pengulangan 3

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.60 Rf	3.3 AU	0.64 Rf	103.7 AU	100.00 %	0.67 Rf	2.7 AU	3644.2 AU	100.00 %	AutoGenerated3

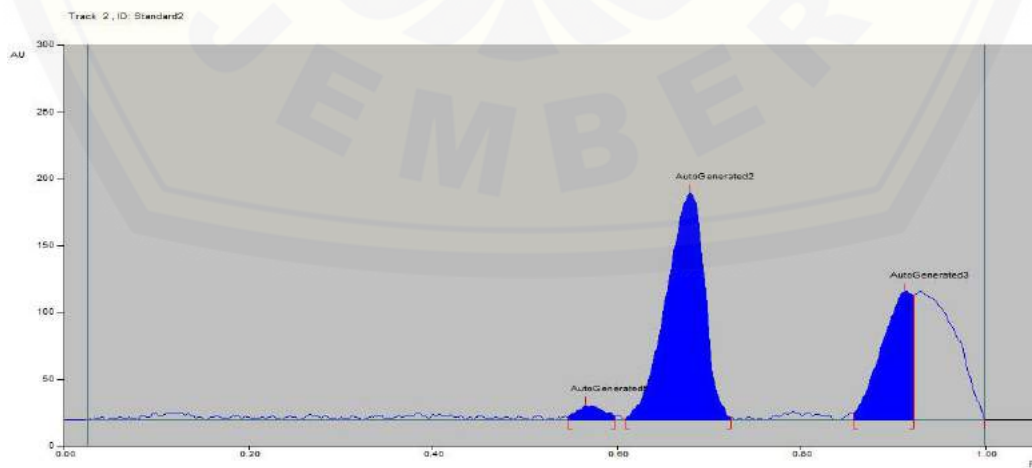


C.6 Densitogram Sampel Dengan Eluen Metanol : Kloroform

Metanol : Kloroform = 1 : 4

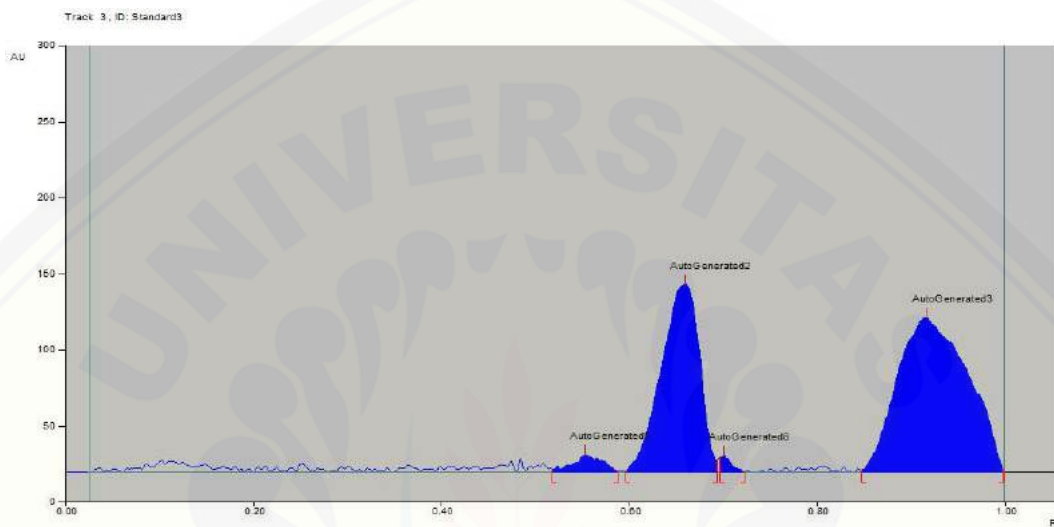
Pengulangan 1

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	0.9 AU	0.72 Rf	140.0 AU	100.00 %	0.74 Rf	8.1 AU	5077.7 AU	100.00 %	AutoGenerated2



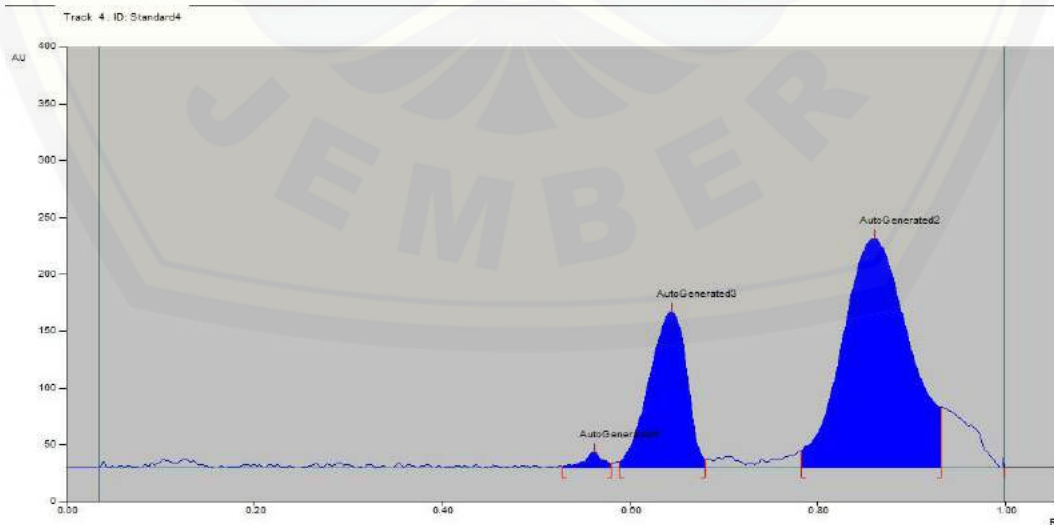
Pengulangan 2

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	0.9 AU	0.71 Rf	140.0 AU	100.00 %	0.74 Rf	8.1 AU	3750.8 AU	100.00 %	AutoGenerated2



Pengulangan 3

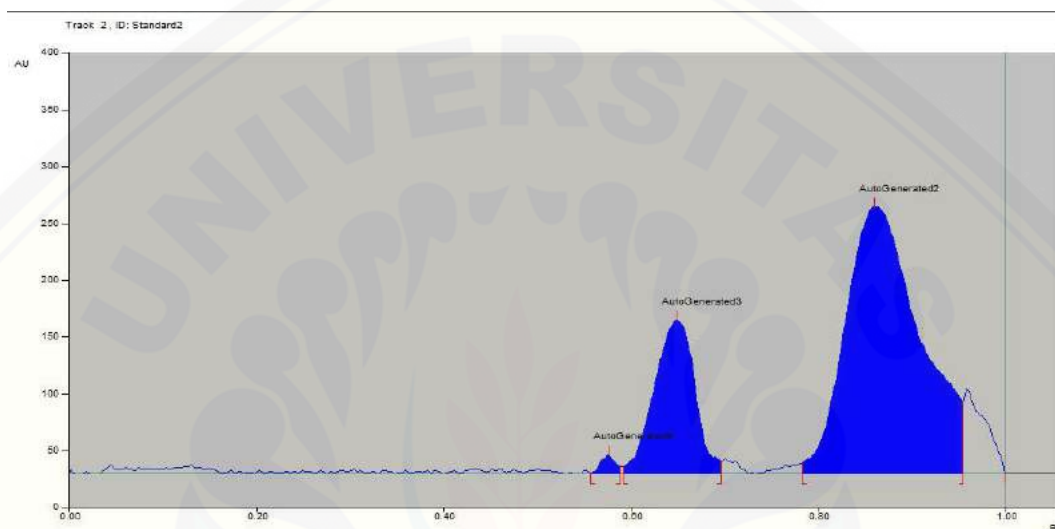
Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	0.9 AU	0.71 Rf	140.0 AU	100.00 %	0.74 Rf	8.1 AU	4849.2 AU	100.00 %	AutoGenerated2



Metanol : Kloroform = 2 : 3

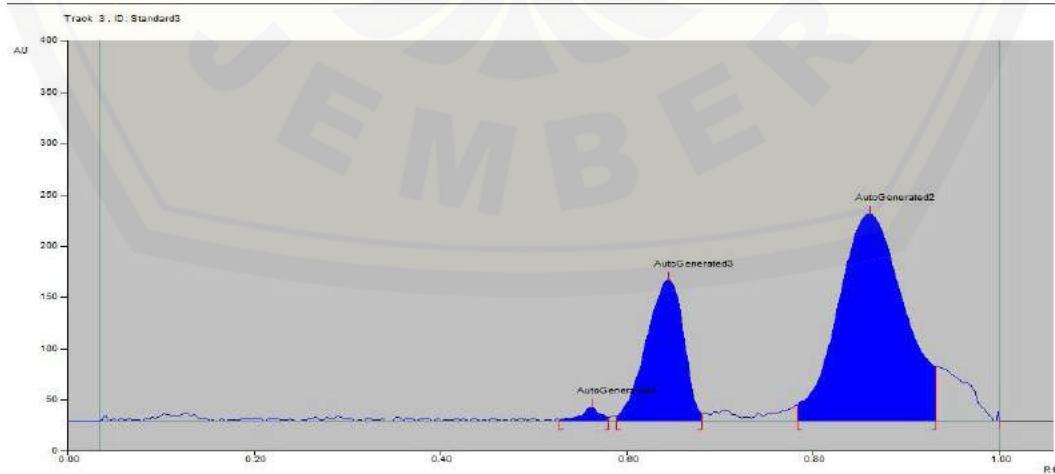
Pengulangan 1

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.60 Rf	0.2 AU	0.66 Rf	131.9 AU	100.00 %	0.70 Rf	0.1 AU	3746.2 AU	100.00 %	AutoGenerated2



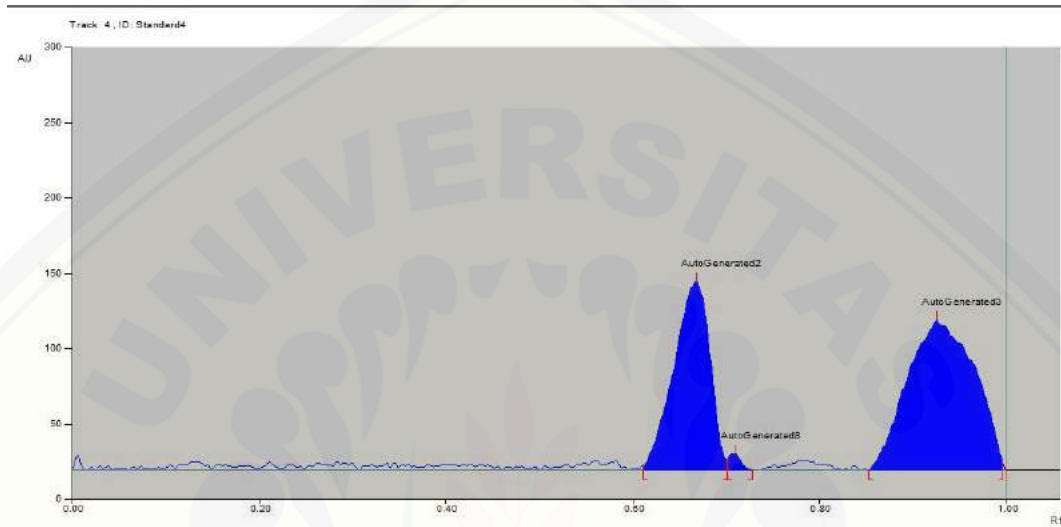
Pengulangan 2

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	1.8 AU	0.67 Rf	120.6 AU	100.00 %	0.70 Rf	0.8 AU	3595.4 AU	100.00 %	AutoGenerated2



Pengulangan 3

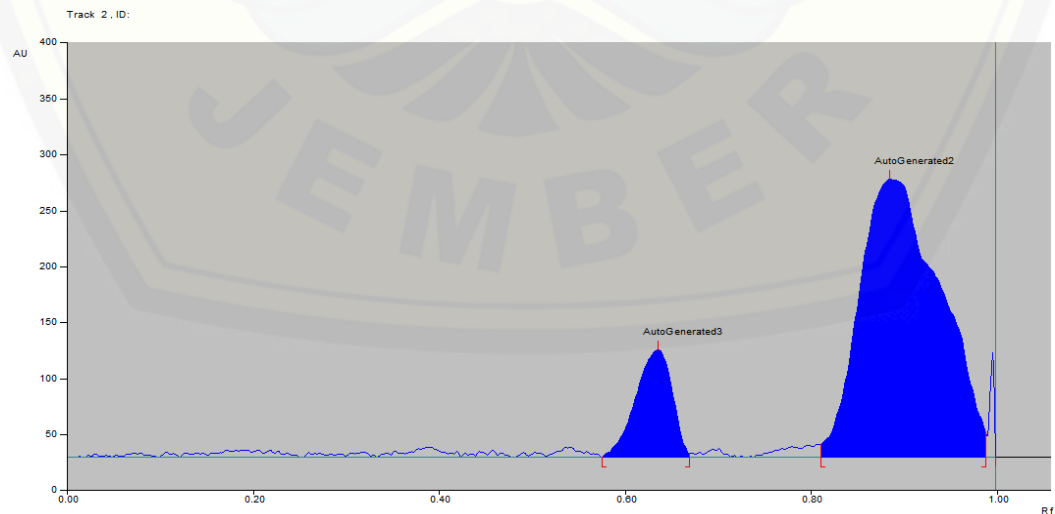
Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	0.9 AU	0.69 Rf	140.0 AU	100.00 %	0.70 Rf	8.1 AU	3424.5 AU	100.00 %	AutoGenerated2



Metanol : Kloroform = 1 : 1

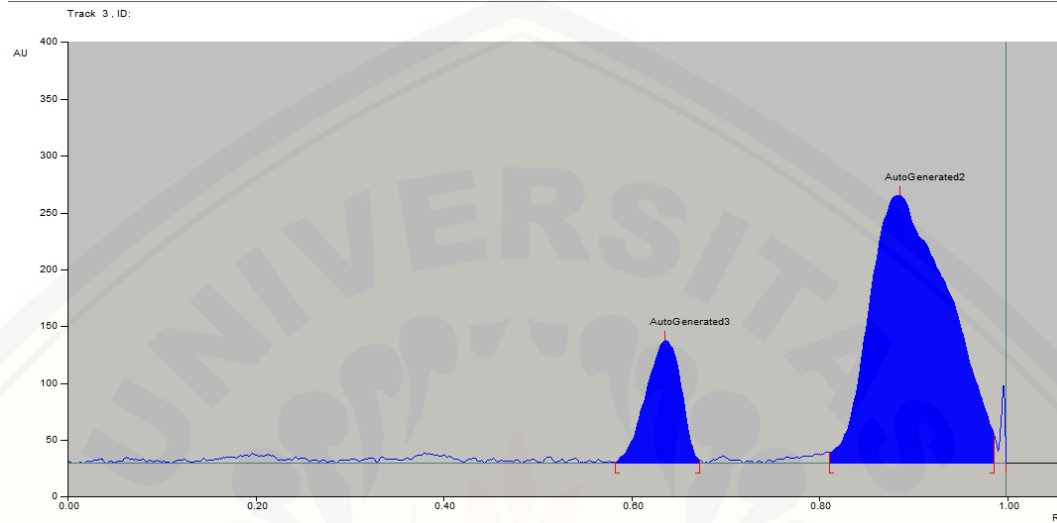
Pengulangan 1

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.60 Rf	8.9 AU	0.64 Rf	117.4 AU	100.00 %	0.68 Rf	8.3 AU	3750.8 AU	100.00 %	AutoGenerated3



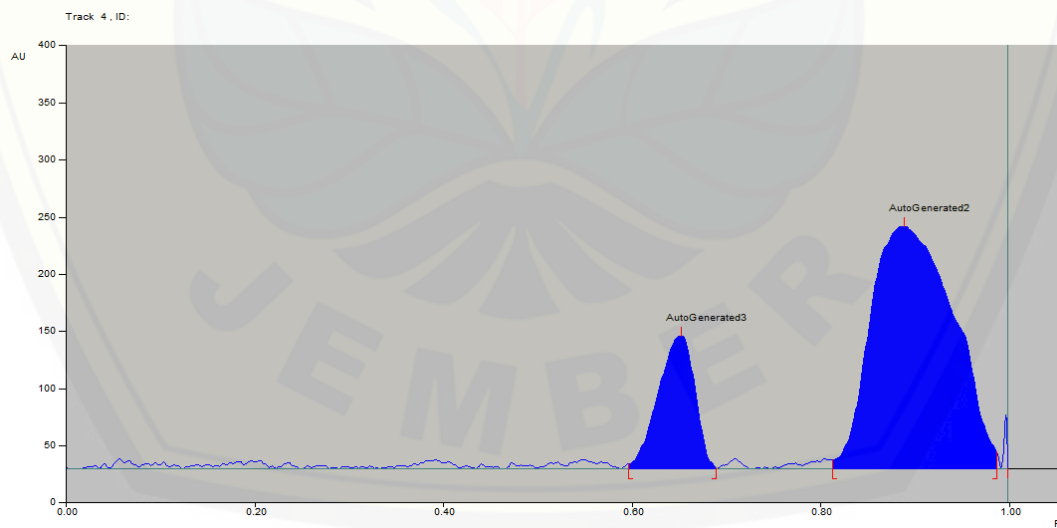
Pengulangan 2

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.60 Rf	3.3 AU	0.64 Rf	103.7 AU	100.00 %	0.67 Rf	2.7 AU	3644.2 AU	100.00 %	AutoGenerated3



Pengulangan 3

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.61 Rf	7.0 AU	0.65 Rf	109.8 AU	100.00 %	0.69 Rf	2.1 AU	3877.7 AU	100.00 %	AutoGenerated3



LAMPIRAN D. DATA PERHITUNGAN KADAR AIR

Pengulangan	Massa Wadah + Sampel (g)	Massa Wadah (g)	Massa Awal Sampel (g)	Massa Akhir Sampel (g)
1	37,857	36,941	1,00	0,916
2	37,623	36,709	1,00	0,914
3	40,112	39,196	1,00	0,916

$$\text{Kadar Air} : \frac{\text{massa awal sampel} - \text{massa akhir sampel}}{\text{massa awal sampel}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Air} : \frac{1,00 \text{ g} - 0,916 \text{ g}}{1,00 \text{ g}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Air} : 8,4 \%$$

LAMPIRAN E. DATA VALIDASI METODE

E.1 Linieritas

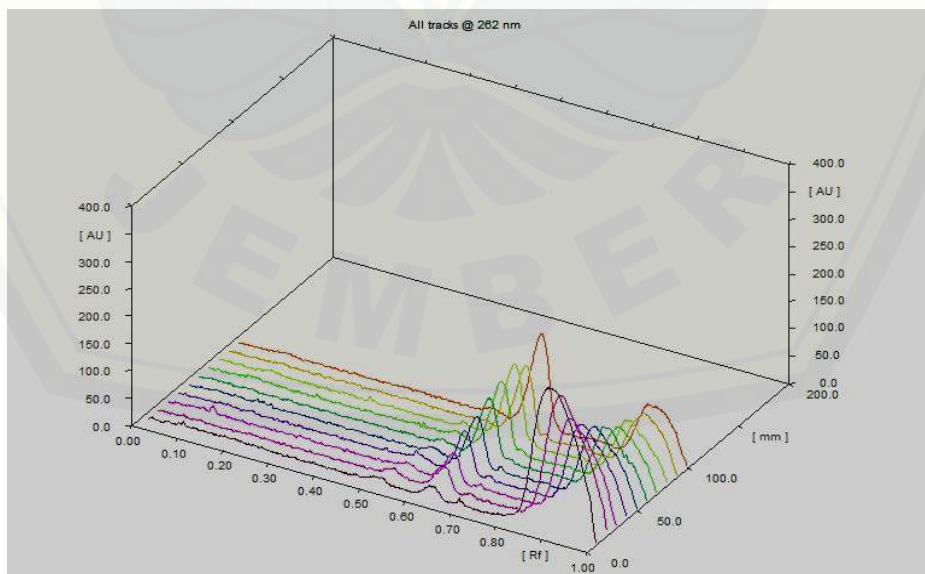
- Hasil pemindaian TLC Scanner penentuan daerah linier

Track	Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	1	0.60 Rf	0.3 AU	0.64 Rf	19.8 AU	100.00 %	0.66 Rf	0.9 AU	570.3 AU	100.00 %	AutoGenerated2
2	1	0.61 Rf	4.1 AU	0.64 Rf	41.5 AU	100.00 %	0.67 Rf	0.2 AU	1239.3 AU	100.00 %	AutoGenerated2
3	1	0.60 Rf	0.8 AU	0.64 Rf	47.4 AU	100.00 %	0.67 Rf	1.1 AU	1465.2 AU	100.00 %	AutoGenerated2
4	1	0.60 Rf	0.8 AU	0.64 Rf	71.9 AU	100.00 %	0.68 Rf	0.5 AU	2310.8 AU	100.00 %	AutoGenerated2
5	1	0.61 Rf	2.4 AU	0.65 Rf	86.4 AU	100.00 %	0.68 Rf	1.6 AU	2964.3 AU	100.00 %	AutoGenerated2
6	1	0.61 Rf	3.6 AU	0.65 Rf	100.8 AU	100.00 %	0.69 Rf	0.0 AU	3595.4 AU	100.00 %	AutoGenerated2
7	1	0.60 Rf	0.5 AU	0.65 Rf	115.9 AU	100.00 %	0.69 Rf	1.4 AU	4392.7 AU	100.00 %	AutoGenerated2
8	1	0.60 Rf	0.2 AU	0.66 Rf	131.9 AU	100.00 %	0.70 Rf	0.1 AU	4970.8 AU	100.00 %	AutoGenerated2
9	1	0.61 Rf	1.8 AU	0.67 Rf	120.6 AU	100.00 %	0.70 Rf	0.8 AU	4460.5 AU	100.00 %	AutoGenerated2
10	1	0.61 Rf	0.9 AU	0.68 Rf	140.0 AU	100.00 %	0.70 Rf	8.1 AU	5077.7 AU	100.00 %	AutoGenerated2

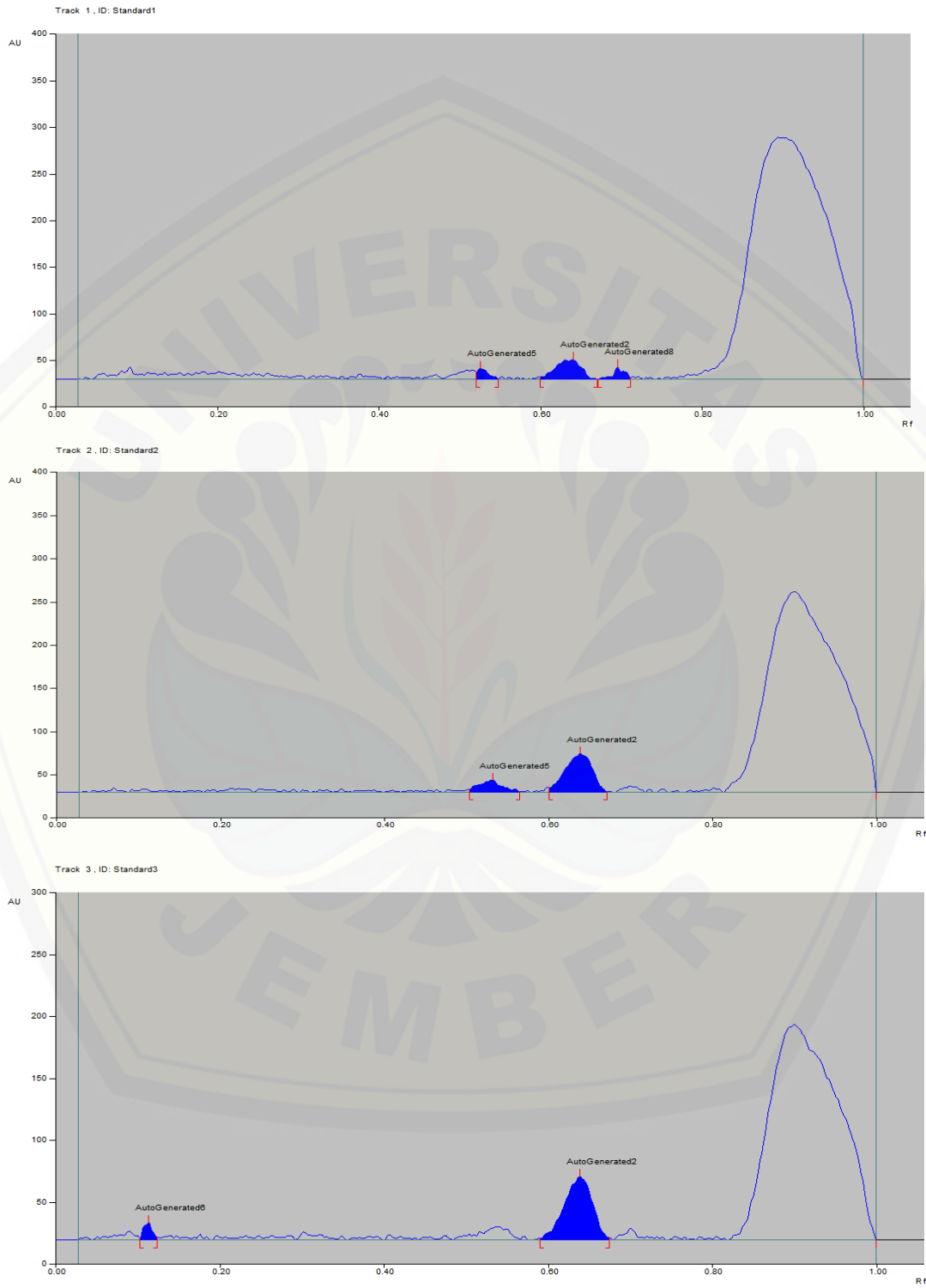
- Data pemindaian dengan *TLC Scanner* kurva kalibrasi daerah linier

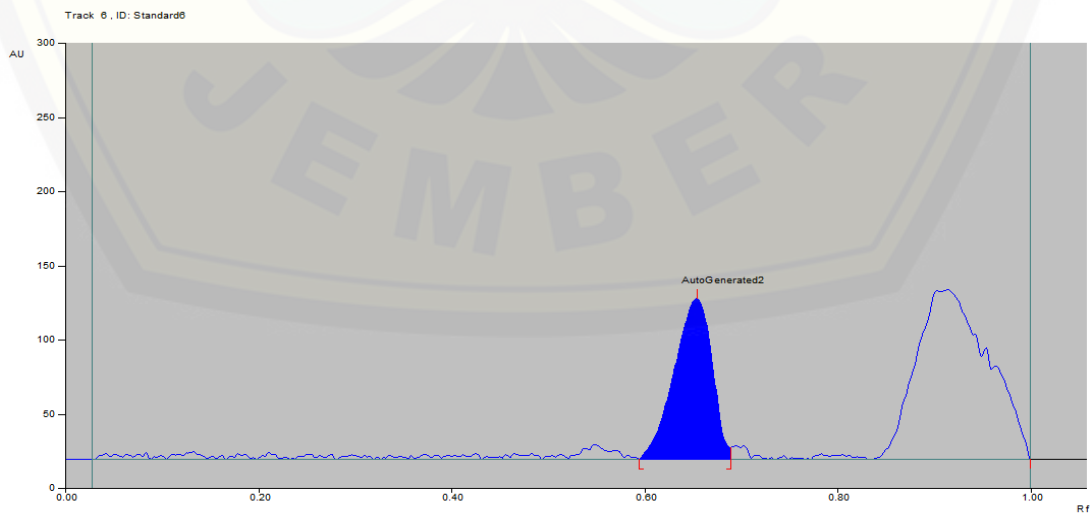
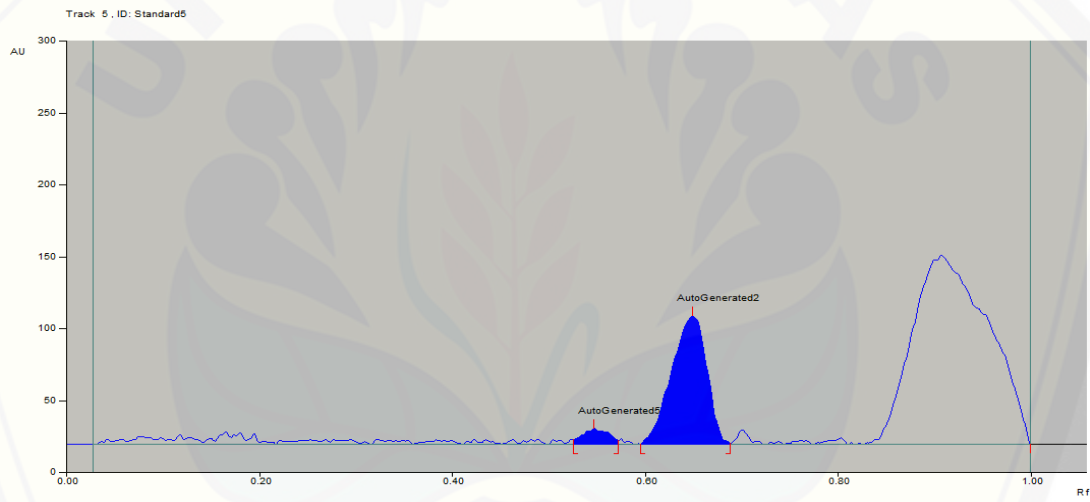
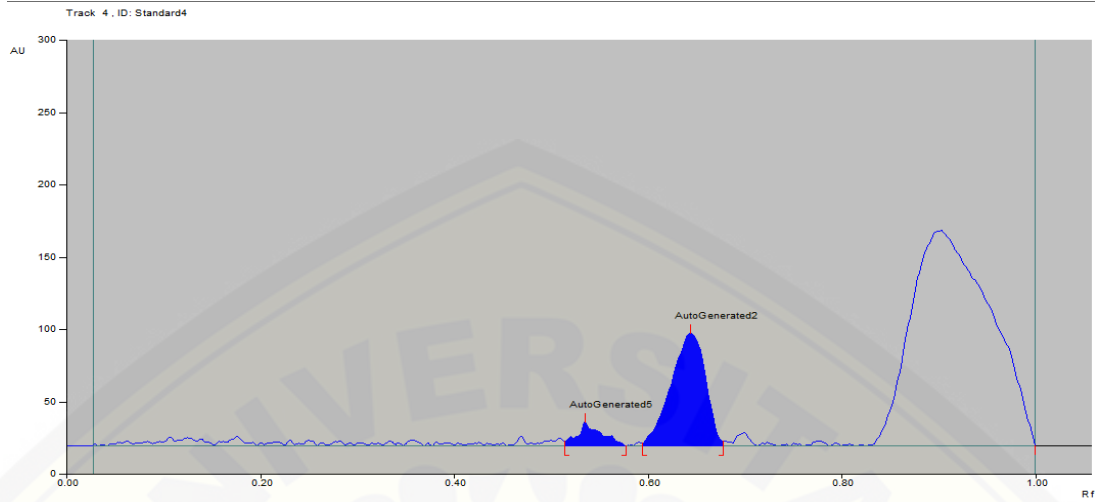
Track	Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
3	1	0.60 Rf	0.8 AU	0.64 Rf	47.4 AU	100.00 %	0.67 Rf	1.1 AU	1465.2 AU	100.00 %	AutoGenerated2
4	1	0.60 Rf	0.8 AU	0.64 Rf	71.9 AU	100.00 %	0.68 Rf	0.5 AU	2310.8 AU	100.00 %	AutoGenerated2
5	1	0.61 Rf	2.4 AU	0.65 Rf	86.4 AU	100.00 %	0.68 Rf	1.6 AU	2964.3 AU	100.00 %	AutoGenerated2
6	1	0.61 Rf	3.6 AU	0.65 Rf	100.8 AU	100.00 %	0.69 Rf	0.0 AU	3595.4 AU	100.00 %	AutoGenerated2
7	1	0.60 Rf	0.5 AU	0.65 Rf	115.9 AU	100.00 %	0.69 Rf	1.4 AU	4392.7 AU	100.00 %	AutoGenerated2
8	1	0.60 Rf	0.2 AU	0.66 Rf	131.9 AU	100.00 %	0.70 Rf	0.1 AU	4970.8 AU	100.00 %	AutoGenerated2

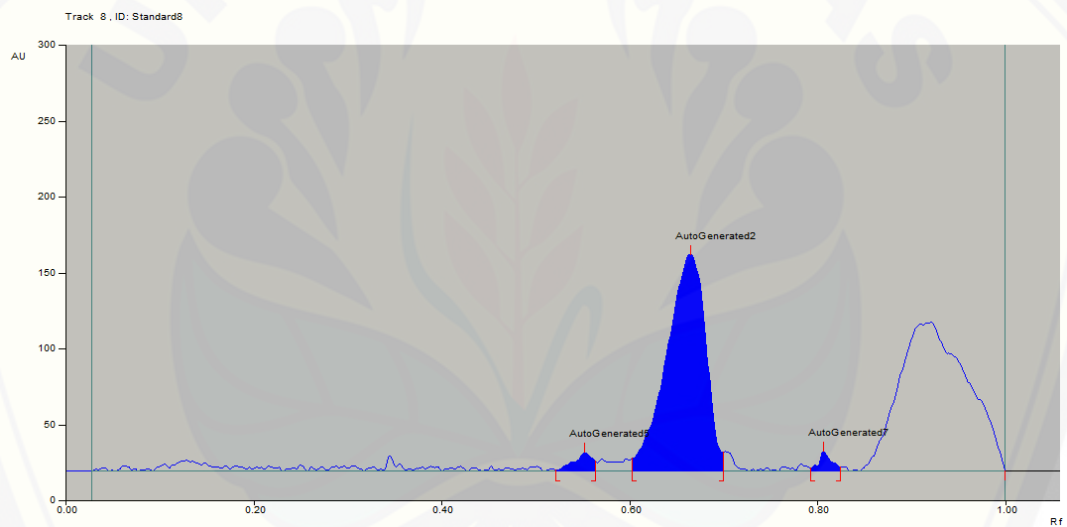
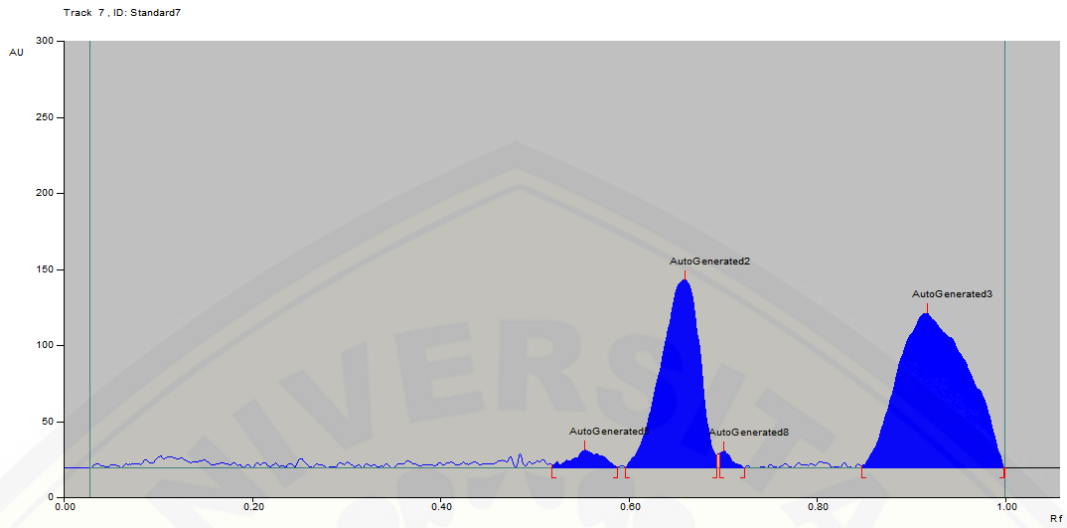
- Densitogram kurva kalibrasi daerah linier

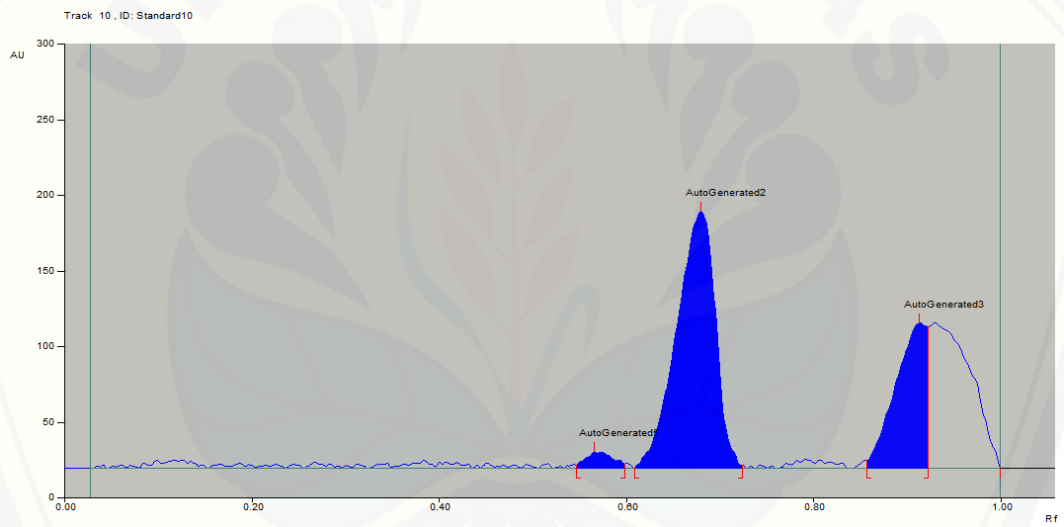
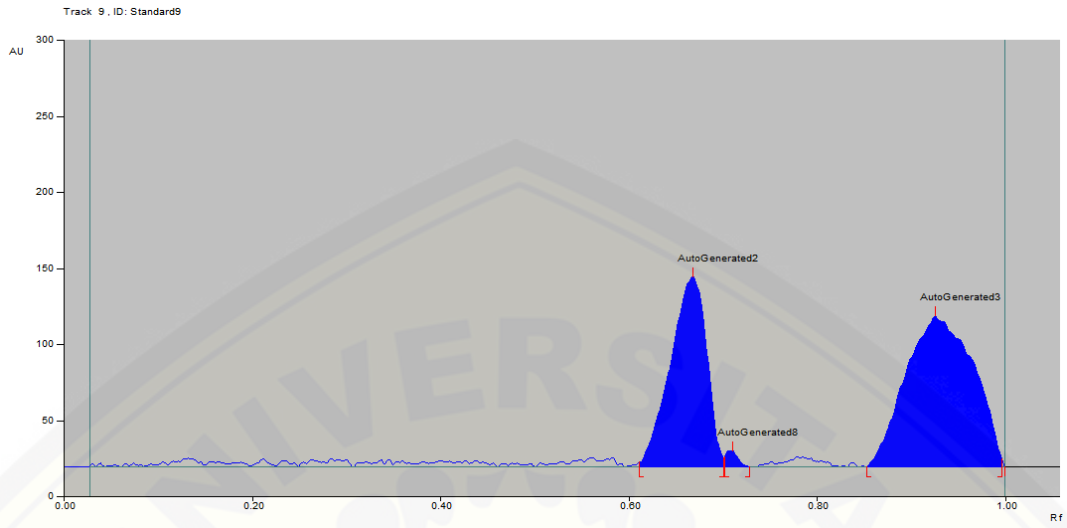


■ Densitogram uji linieritas









E.2 LOD dan LOQ

No.	Massa Analit (ng)	Area (Yi)	Yi*	(Yi-Yi*) ²
1	600	1465,2	1539,8	5565,16
2	800	2310,8	2237,0	5446,44
3	1000	2964,3	2934,2	906,010
4	1200	3595,4	3631,4	1296,00
5	1400	4392,7	4328,6	4108,81
6	1600	4970,8	5025,8	6724,00
			Jumlah	24046,42

Keterangan:

Massa Analit (ng) = *Konsentrasi analit standar* $\frac{ng}{\mu L} \times \text{volume penotolan}(\mu L)$

Yi = luas area yang dimasukkan kedalam persamaan kurva kalibrasi

Yi didapatkan dari persamaan regresi, misalnya untuk konsentrasi analit (x)=600 ng, maka:

$$y = 3,486x - 551,8 \rightarrow y = 3,486(600) - 551,8$$

$$y = 1539,8$$

$S_{\frac{y}{x}}$ = variasi variabel respon (y), didapat dari data-data yang dekat dengan garis regresi

$$= \sqrt{\frac{\sum Y - Yi^2}{N - 2}} = \sqrt{\frac{24046,42}{4}} = 77,53 \text{ AU}$$

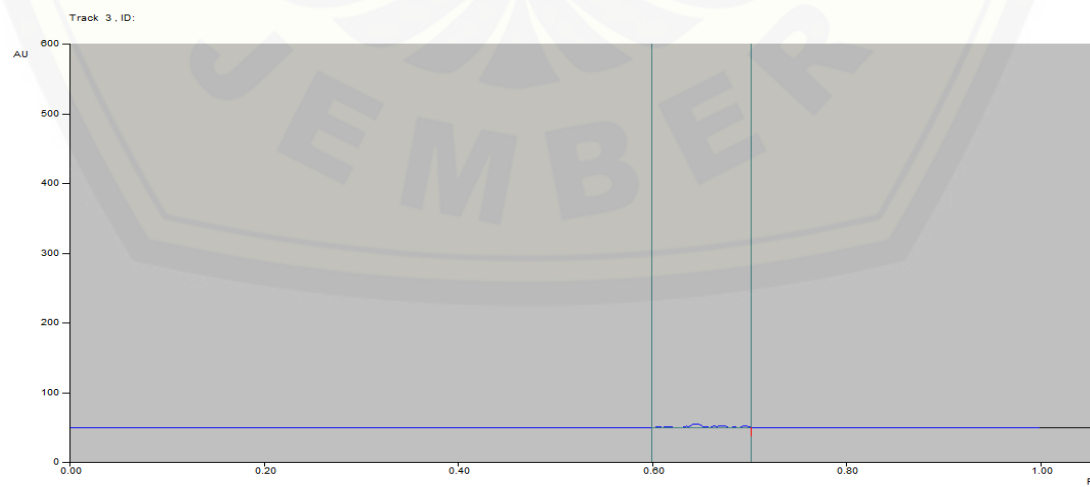
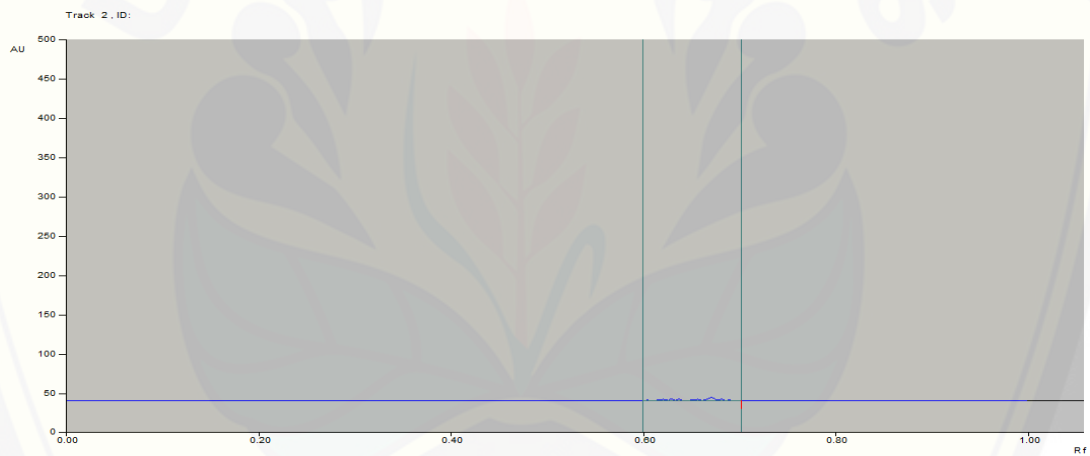
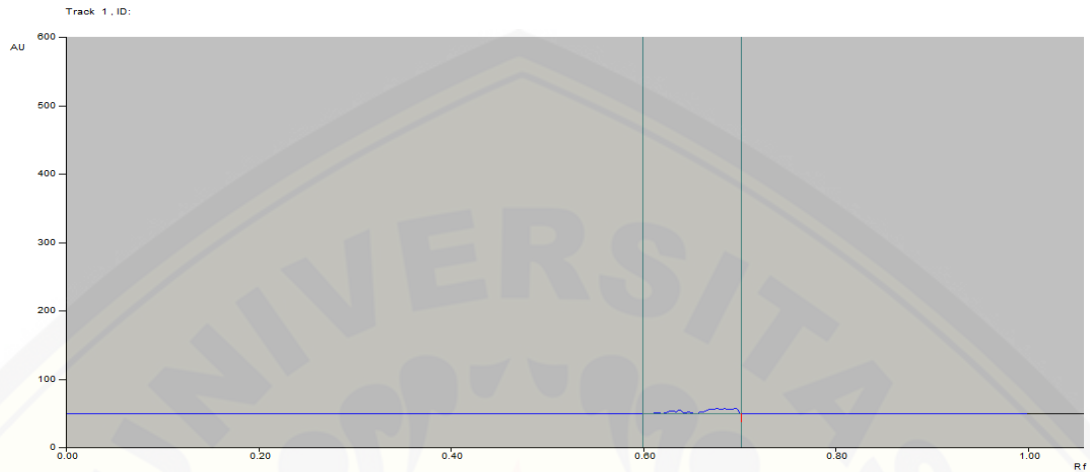
$$LOD = \frac{3S_{\frac{y}{x}}}{b} = \frac{3(77,53)}{3,486} = 66,72 \text{ ng}$$

$$LOQ = \frac{10S_{\frac{y}{x}}}{b} = \frac{10(77,53)}{3,486} = 222,4 \text{ ng}$$

Parameter	Dalam ng	Dalam ppm
Batas Deteksi (LOD)	66,72	3,336
Batas Kuantitasi (LOQ)	222,4	11,12

E.3 Densitogram Larutan Blanko

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
------	----------------	--------------	--------------	------------	-------	--------------	------------	------	--------	--------------------



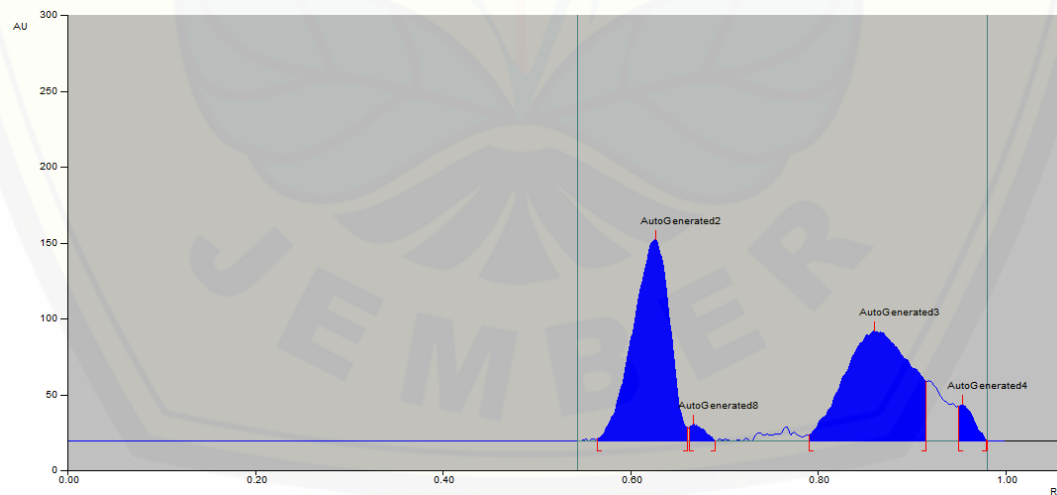
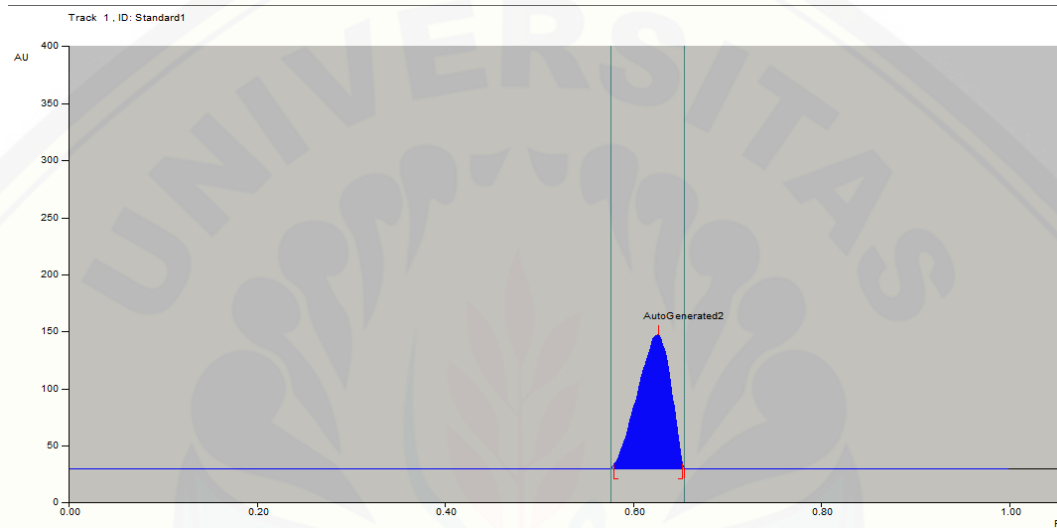
E.4 Kecermatan (*Accuracy*)

1. Standar Adisi Larutan Standar Nikotin 70 ppm

Perhitungan Massa Nikotin 70 ppm yang ditambahkan (m^*)

Volume larutan standar yang ditambahkan = 2 mL

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.58 Rf	2.6 AU	0.63 Rf	124.6 AU	100.00 %	0.66 Rf	0.1 AU	4462.1 AU	100.00 %	AutoGenerated2



- Massa nikotin :
 $4462,1 = 3,486x - 551,8$
 $5013,9 = 3,486x$

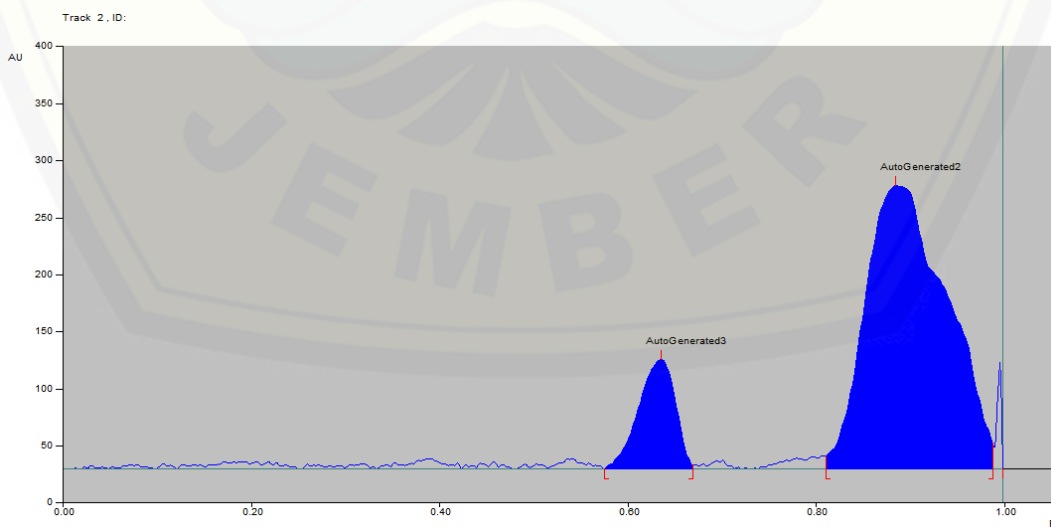
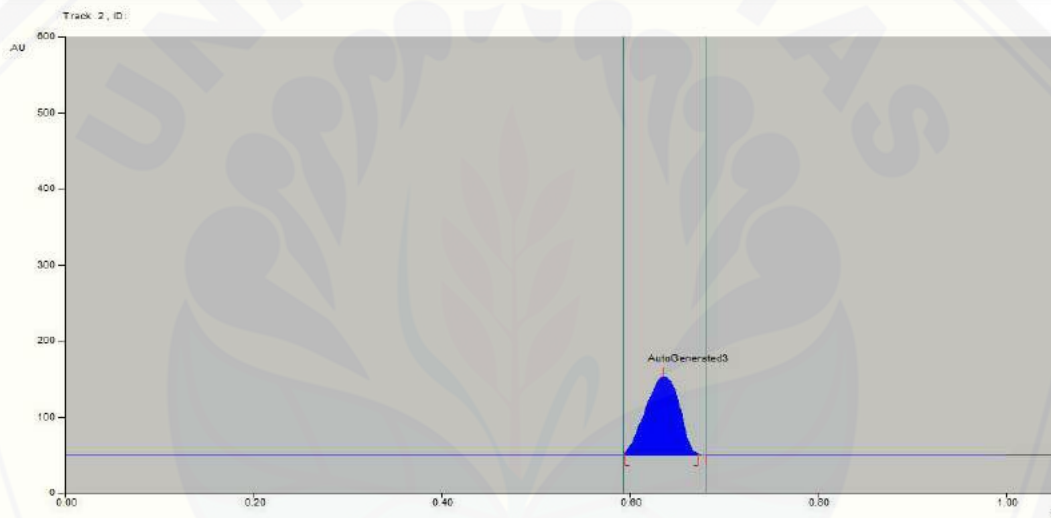
$$x = 1497,3 \text{ ng}$$

- Konsentrasi Nikotin :
 $1497,3 \text{ ng} / 20 \mu\text{L} = 74,865 \text{ ng} / \mu\text{L}$
- Massa Nikotin = $74,865 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times 2000 \mu\text{L} = 1,5 \times 10^5 \text{ ng}$

Data, Densitogram, dan Perhitungan Kadar Sampel Nikotin

Volume yang ditambahkan = 2 mL

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.60 Rf	3.3 AU	0.64 Rf	103.7 AU	100.00 %	0.67 Rf	2.7 AU	3644.2 AU	100.00 %	AutoGenerated3

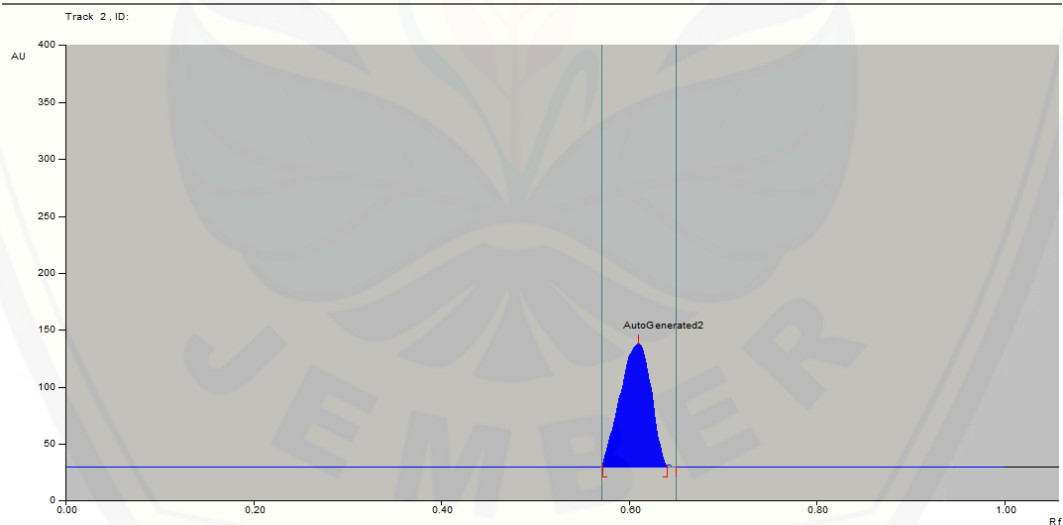


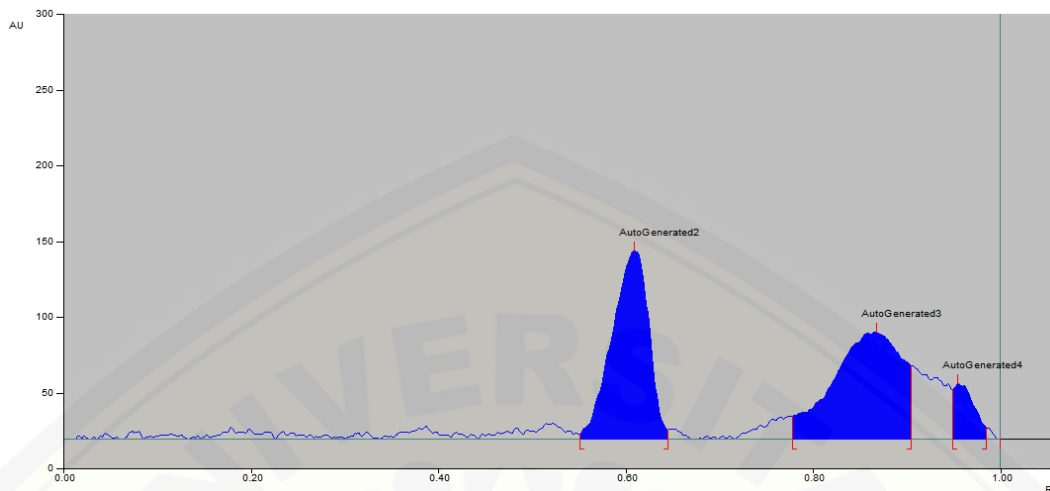
- Massa nikotin :
 $3644,2 = 3,486x - 551,8$
 $4196,0 = 3,486x$
 $x = 1203,7 \text{ ng}$
- Konsentrasi Nikotin :
 $1203,7 \text{ ng} / 20 \mu\text{L} = 60,185 \text{ ng} / \mu\text{L}$
- Massa Nikotin yang didapat (m_a):
 $60,185 \text{ ng} / \mu\text{L} \times 2000 \mu\text{L} = 120,370 \times 10^3 \text{ ng}$

Data, Densitogram, dan Perhitungan kadar Nikotin + Larutan Standar 70 ppm

Volume total Campuran = volume sampel Nikotin + volume larutan standar 70 ppm = 4 mL

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.57 Rf	2.5 AU	0.63 Rf	108.2 AU	100.00 %	0.64 Rf	1.6 AU	3472.6 AU	100.00 %	AutoGenerated2





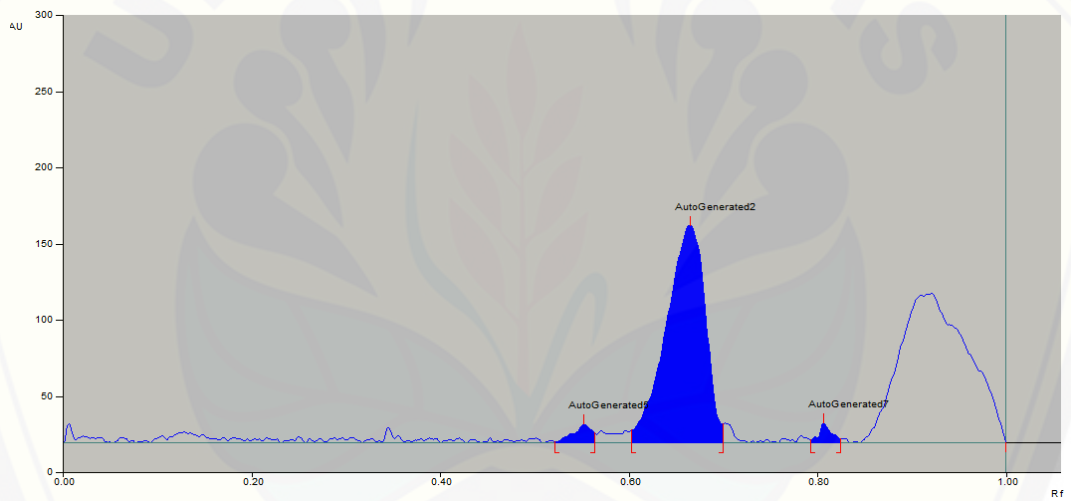
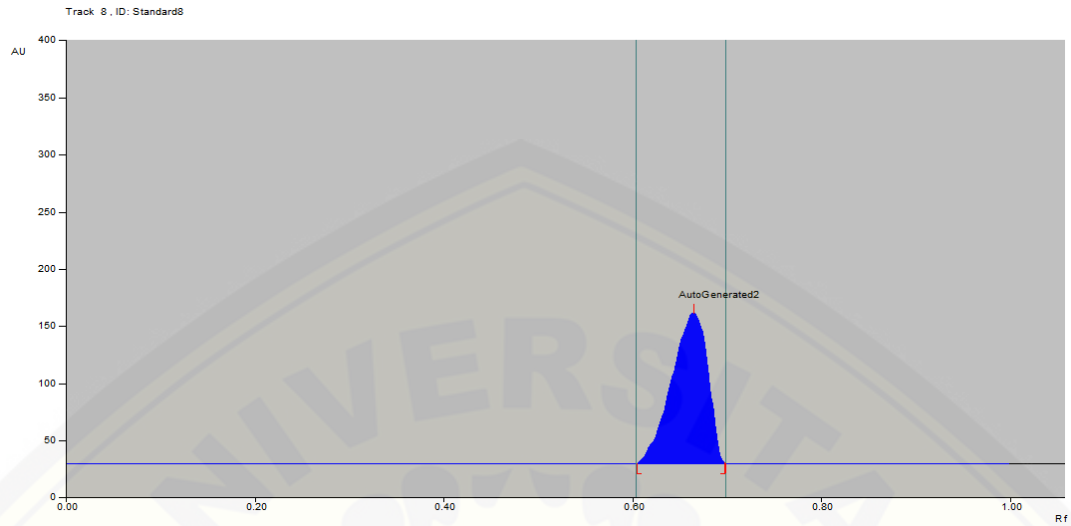
- Massa nikotin :
 $3472,6 = 3,486x - 551,8$
 $4024,4 = 3,486x$
 $x = 1154,4 \text{ ng}$
- Konsentrasi Nikotin :
 $1154,4 \text{ ng} / 20 \mu\text{L} = 57,72 \text{ ng} / \mu\text{L}$
- Massa Nikotin dalam larutan (m_f):
 $57,72 \text{ ng} / \mu\text{L} \times 4000 \mu\text{L} = 230,880 \times 10^3 \text{ ng}$

2. Standar Adisi Larutan Standar Nikotin 80 ppm

Perhitungan Massa Nikotin 80 ppm yang ditambahkan (m^*)

Volume larutan standar yang ditambahkan = 2 mL

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.60 Rf	0.9 AU	0.64 Rf	117.4 AU	100.00 %	0.66 Rf	0.3 AU	4849.2 AU	100.00 %	AutoGenerated3



- Massa nikotin :

$$4849,2 = 3,486x - 551,8$$

$$5401,0 = 3,486x$$

$$x = 1549,3 \text{ ng}$$

- Konsentrasi Nikotin :

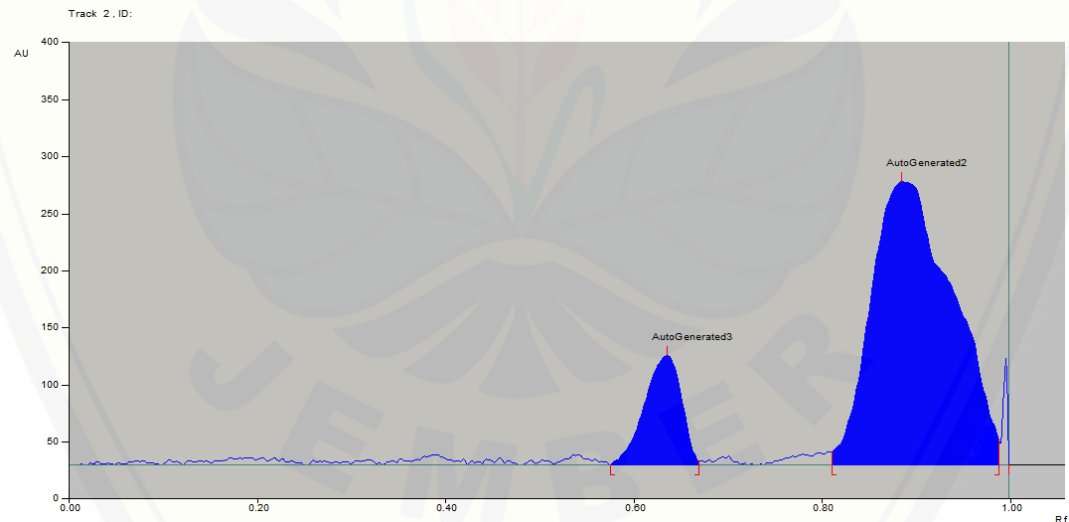
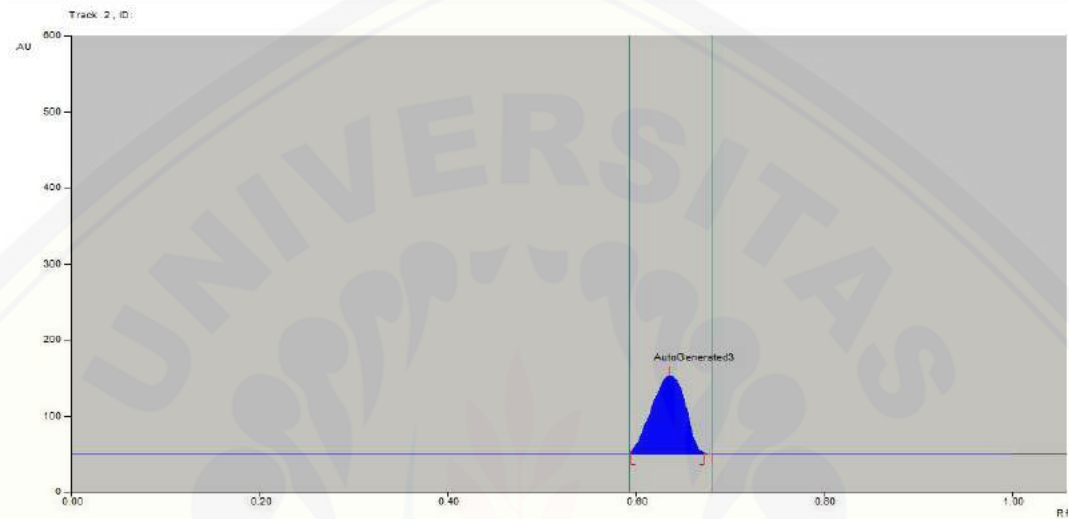
$$1549,3 \text{ ng} / 20 \mu\text{L} = 77,467 \text{ ng} / \mu\text{L}$$

$$\text{Massa Nikotin} = 77,467 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times 2000 \mu\text{L} = 1,55 \times 10^5 \text{ ng}$$

Data, Densitogram, dan Perhitungan Kadar Sampel Nikotin

Volume yang ditambahkan = 2 mL

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.60 Rf	3.3 AU	0.64 Rf	103.7 AU	100.00 %	0.67 Rf	2.7 AU	3644.2 AU	100.00 %	AutoGenerated3



- Massa nikotin :
 $3644,2 = 3,486x - 551,8$
 $4196,0 = 3,486x$
 $x = 1311,8 \text{ ng}$
- Konsentrasi Nikotin :

$$1203,7 \text{ ng} / 20 \mu\text{L} = 60,185 \text{ ng} / \mu\text{L}$$

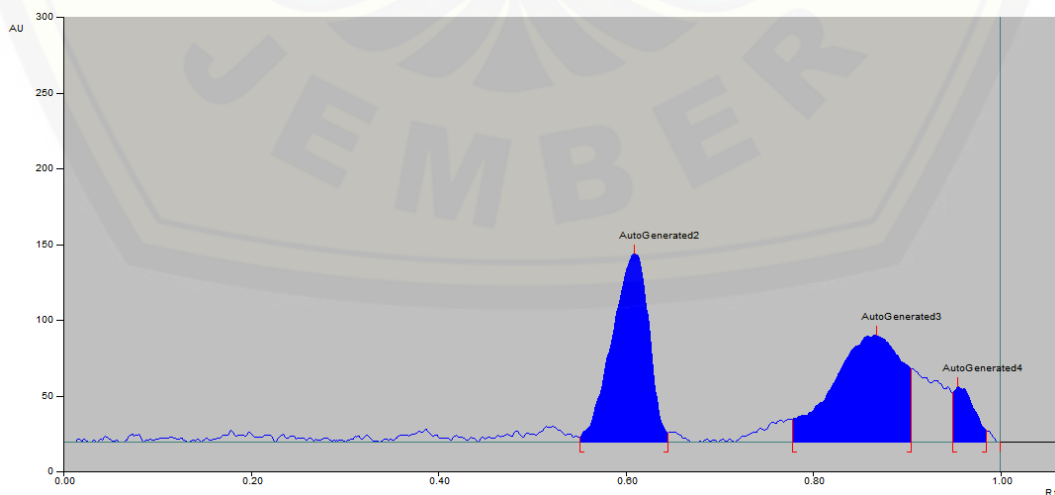
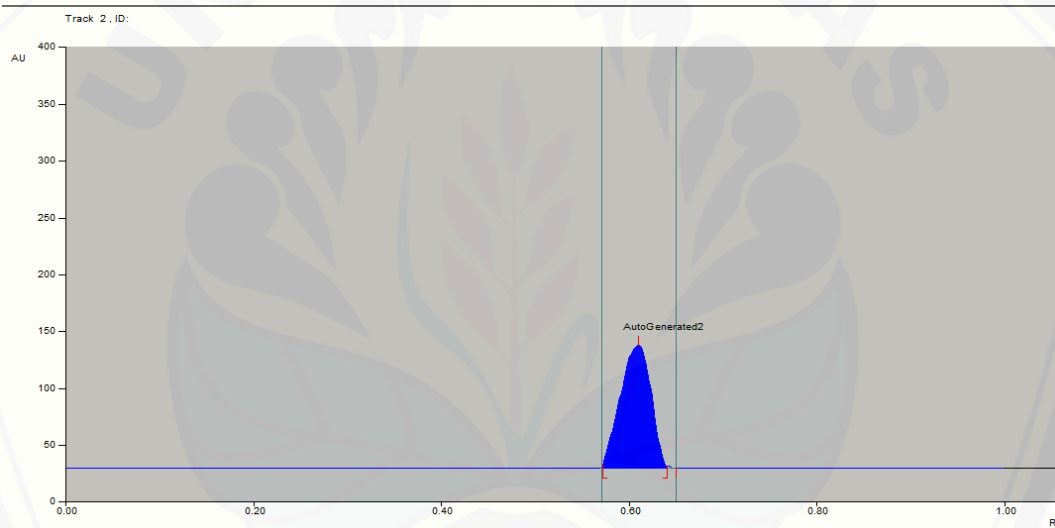
- Massa Nikotin yang didapat (m_a):

$$65,59 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 2000 \mu\text{L} = 120,370 \times 10^3 \text{ ng}$$

Data, Densitogram, dan Perhitungan kadar Nikotin + Larutan Standar 80 ppm

Volume total Campuran = volume sampel Nikotin + volume larutan standar 80 ppm = 4 mL

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.57 Rf	2.5 AU	0.63 Rf	108.2 AU	100.00 %	0.84 Rf	1.6 AU	3746.2 AU	100.00 %	AutoGenerated2



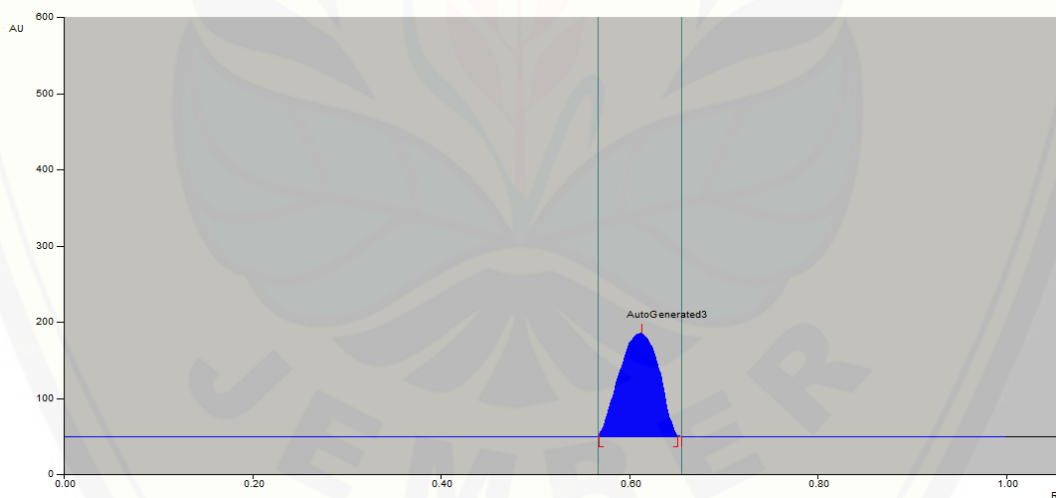
- Massa nikotin :
 $3746,2 = 3,486x - 551,8$
 $4298,0 = 3,486x$
 $x = 1239,3 \text{ ng}$
- Konsentrasi Nikotin :
 $1239,3 \text{ ng} / 20 \text{ } \mu\text{L} = 61,965 \text{ ng} / \mu\text{L}$
- Massa Nikotin dalam larutan (m_f):
 $61,965 \text{ ng} / \mu\text{L} \times 4000 \text{ } \mu\text{L} = 247,860 \times 10^3 \text{ ng}$

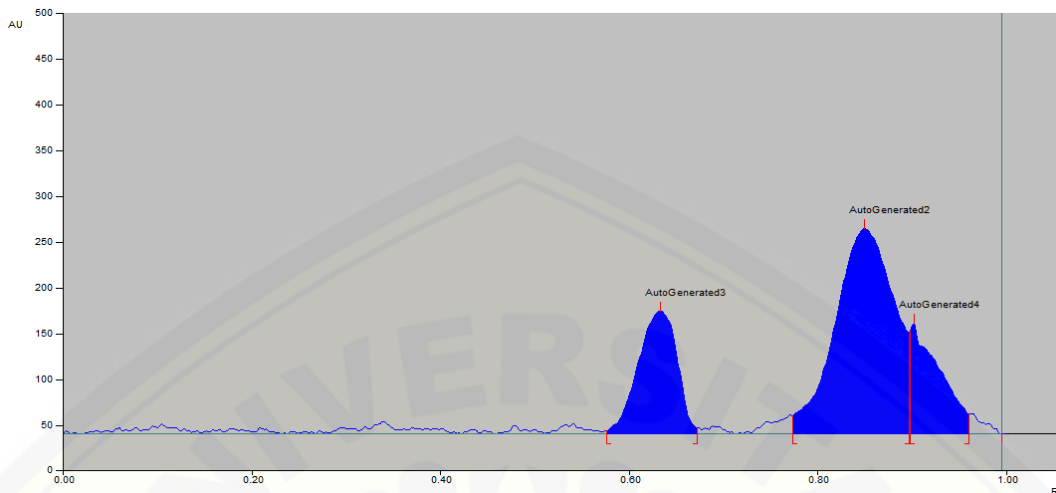
3. Standar Adisi Larutan Standar Nikotin 90 ppm

Perhitungan Massa Nikotin 90 ppm yang ditambahkan ($m^* a$)

Volume larutan standar yang ditambahkan = 2 mL

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0,60 Rf	0,9 AU	0,64 Rf	117,4 AU	100,00 %	0,66 Rf	0,3 AU	4849,2 AU	100,00 %	AutoGenerated3



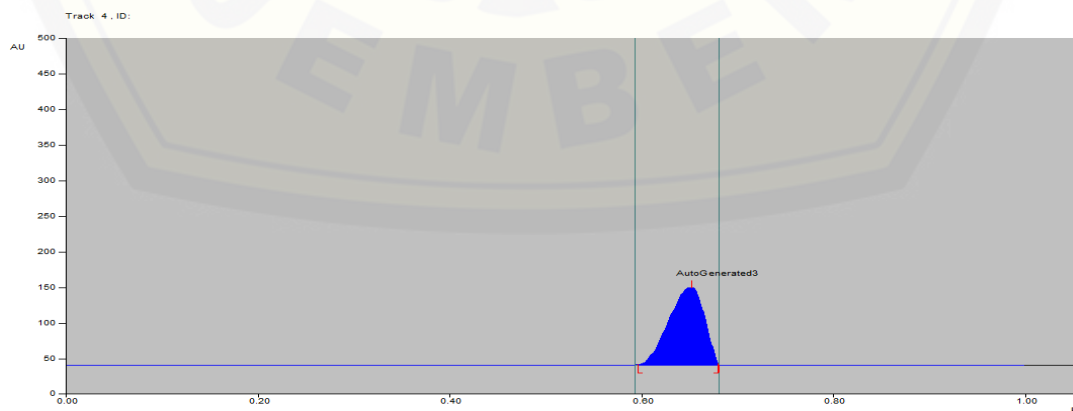


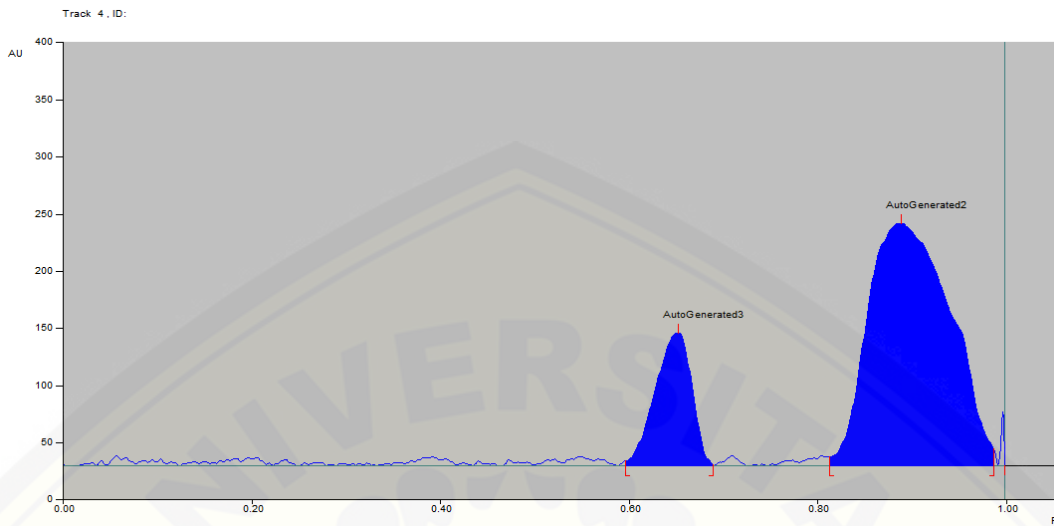
- Massa nikotin :
 $5725,6 = 3,486x - 551,8$
 $6277,4 = 3,486x$
 $x = 1800,7 \text{ ng}$
- Konsentrasi Nikotin :
 $1800,7 \text{ ng} / 20 \mu\text{L} = 90,037 \text{ ng} / \mu\text{L}$
- Massa Nikotin = $90,037 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times 2000 \mu\text{L} = 1,8 \times 10^5 \text{ ng}$

Data, Densitogram, dan Perhitungan Kadar Sampel Nikotin

Volume yang ditambahkan = 2 mL

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.60 Rf	1.1 AU	0.65 Rf	109.0 AU	100.00 %	0.68 Rf	2.3 AU	3970.7 AU	100.00 %	AutoGenerated3



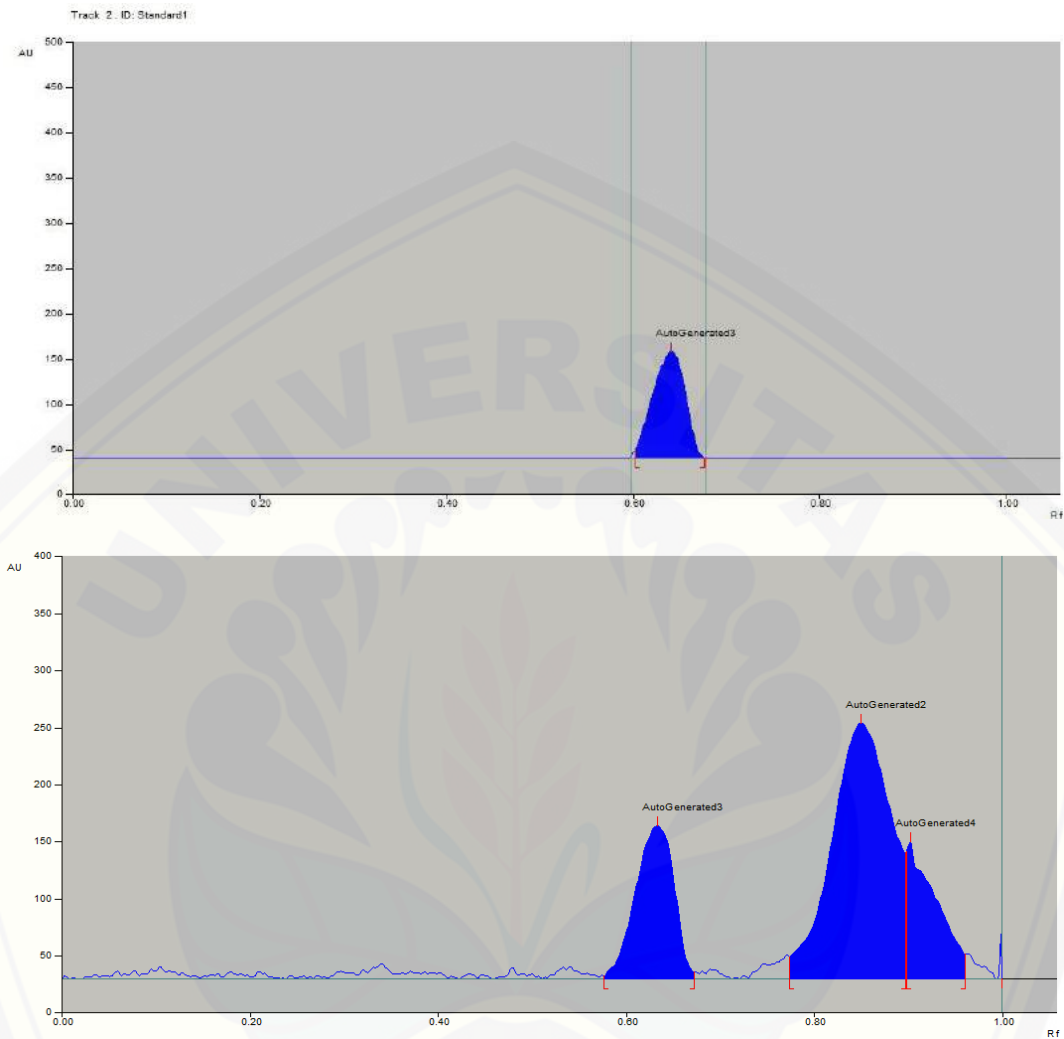


- Massa nikotin :
 $3970,7 = 3,486x - 551,8$
 $4522,5 = 3,486x$
 $x = 1297,3 \text{ ng}$
- Konsentrasi Nikotin :
 $1297,3 \text{ ng} / 20 \mu\text{L} = 64,865 \text{ ng} / \mu\text{L}$
- Massa Nikotin yang didapat (m_a):
 $64,865 \text{ ng} / \mu\text{L} \times 2000 \mu\text{L} = 129,730 \times 10^3 \text{ ng}$

Data, Densitogram, dan Perhitungan kadar Nikotin + Larutan Standar 90 ppm

Volume total Campuran = volume sampel Nikotin + volume larutan standar 70 ppm = 4 mL

Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.57 Rf	2.0 AU	0.63 Rf	125.2 AU	100.00 %	0.65 Rf	1.8 AU	4930.4 AU	100.00 %	AutoGenerated5



- Massa nikotin :
 $4630,4 = 3,486x - 551,8$
 $5182,2 = 3,486x$
 $x = 1486,6 \text{ ng}$
- Konsentrasi Nikotin :
 $1486,6 \text{ ng} / 20 \mu\text{L} = 74,329 \text{ ng} / \mu\text{L}$
- Massa Nikotin dalam larutan (m_f):
 $74,329 \text{ ng} / \mu\text{L} \times 4000 \mu\text{L} = 297,314 \times 10^3 \text{ ng}$

4. Data Perhitungan Persen Recovery

- Perhitungan % *Recovery* Standar Adisi 70 ppm

$$\begin{aligned}\% \text{ perolehan kembali} &= \frac{m_f - m_a}{m_a^*} \times 100\% \\ &= \frac{249,667 \times 10^3 \text{ ng} - 122,217 \times 10^3 \text{ ng}}{1,4 \times 10^5 \text{ ng}} \times 100\% = 91 \%\end{aligned}$$

- Perhitungan % *Recovery* Standar Adisi 80 ppm

$$\begin{aligned}\% \text{ perolehan kembali} &= \frac{m_f - m_a}{m_a^*} \times 100\% \\ &= \frac{256,228 \times 10^3 \text{ ng} - 122,217 \times 10^3 \text{ ng}}{1,5 \times 10^5 \text{ ng}} \times 100\% = 89 \%\end{aligned}$$

- Perhitungan % *Recovery* Standar Adisi 90 ppm

$$\begin{aligned}\% \text{ perolehan kembali} &= \frac{m_f - m_a}{m_a^*} \times 100\% \\ &= \frac{279,972 \times 10^3 \text{ ng} - 126,347 \times 10^3 \text{ ng}}{1,8 \times 10^5 \text{ ng}} \times 100\% = 86 \%\end{aligned}$$

Ulangan Ke-	Konsentrasi Nikotin	m_f	m_a	m_a^*	Recovery
1	70 ppm	$230,880 \times 10^3$ ng	$120,370 \times 10^3$ ng	$1,5 \times 10^5$ ng	91% \pm 7,6
2		$271,628 \times 10^3$ ng	$122,240 \times 10^3$ ng	$1,4 \times 10^5$ ng	
3		$247,492 \times 10^3$ ng	$114,042 \times 10^3$ ng	$1,3 \times 10^5$ ng	
Rata-rata		$249,667 \times 10^3$ ng	$122,217 \times 10^3$ ng	$1,4 \times 10^5$ ng	
1	80 ppm	$247,860 \times 10^3$ ng	$120,370 \times 10^3$ ng	$1,5 \times 10^5$ ng	89 % \pm 5,5
2		$269,512 \times 10^3$ ng	$122,240 \times 10^3$ ng	$1,6 \times 10^5$ ng	
3		$251,312 \times 10^3$ ng	$114,042 \times 10^3$ ng	$1,6 \times 10^5$ ng	
Rata-rata		$256,228 \times 10^3$ ng	$122,217 \times 10^3$ ng	$1,5 \times 10^5$ ng	
1	90 ppm	$297,314 \times 10^3$ ng	$129,730 \times 10^3$ ng	$1,8 \times 10^5$ ng	86 % \pm 6,5
2		$270,916 \times 10^3$ ng	$122,240 \times 10^3$ ng	$1,7 \times 10^5$ ng	
3		$270,916 \times 10^3$ ng	$127,070 \times 10^3$ ng	$1,8 \times 10^5$ ng	
Rata-rata		$279,972 \times 10^3$ ng	$126,347 \times 10^3$ ng	$1,8 \times 10^5$ ng	

E.5 Keseksamaan (*Precision*)

- Data Scanning dengan *TLC Scanner* Larutan Standar Nikotin 50 ppm (n = 6)

Track	Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	1	0.60 Rf	0.0 AU	0.65 Rf	65.2 AU	100.00 %	0.67 Rf	21.2 AU	2360.3 AU	100.00 %	AutoGenerated3
2	1	0.60 Rf	2.5 AU	0.64 Rf	121.9 AU	100.00 %	0.67 Rf	3.0 AU	2285.0 AU	100.00 %	AutoGenerated3
3	1	0.60 Rf	3.4 AU	0.64 Rf	120.4 AU	100.00 %	0.67 Rf	4.0 AU	2529.5 AU	100.00 %	AutoGenerated3
4	1	0.60 Rf	8.6 AU	0.64 Rf	118.0 AU	100.00 %	0.67 Rf	0.6 AU	2360.3 AU	100.00 %	AutoGenerated3
5	1	0.60 Rf	3.1 AU	0.64 Rf	123.9 AU	100.00 %	0.67 Rf	0.6 AU	2529.5 AU	100.00 %	AutoGenerated3
6	1	0.60 Rf	1.6 AU	0.65 Rf	100.2 AU	100.00 %	0.67 Rf	6.4 AU	2153.4 AU	100.00 %	AutoGenerated3

Konsentrasi Nikotin	Area (x)	$x - \bar{x}$
50 ppm	2360,3	9,366667
50 ppm	2285,0	84,66667
50 ppm	2529,5	-159,833
50 ppm	2360,3	9,366667
50 ppm	2529,5	-159,833
50 ppm	2153,4	216,2667

$$\bar{x} = \frac{14218}{6} = 2369,7$$

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

$$= 145,0576$$

$$SBR = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% =$$

$$\frac{145,0576}{2369,7} = 6,1213\%$$

$$\frac{2}{3} CV \text{ Horwitz} = \frac{2}{3} \times 2^{1-(0,5 \times \log C)}$$

$$= \frac{2}{3} \times 2^{1-(0,5 \times \log(50 \times 10^{-6}))}$$

$$= \frac{2}{3} \times 2^{1-(-5,301)}$$

$$= \frac{2}{3} \times 2^{3,6505}$$

$$= \frac{2}{3} \times 12,557 = 8,371$$

Keterangan : C = rata-rata konsentrasi analit

- Data Scanning dengan *TLC Scanner* Larutan Standar Nikotin 70 ppm (n = 6)

Track	Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	1	0.60 Rf	2.6 AU	0.64 Rf	73.7 AU	100.00 %	0.66 Rf	0.0 AU	2285.0 AU	100.00 %	AutoGenerated3
2	1	0.60 Rf	9.2 AU	0.64 Rf	76.2 AU	100.00 %	0.66 Rf	0.1 AU	2153.4 AU	100.00 %	AutoGenerated3
3	1	0.60 Rf	8.8 AU	0.64 Rf	80.6 AU	100.00 %	0.65 Rf	0.6 AU	2220.0 AU	100.00 %	AutoGenerated3
4	1	0.60 Rf	4.0 AU	0.64 Rf	87.2 AU	100.00 %	0.66 Rf	0.8 AU	2532.5 AU	100.00 %	AutoGenerated3
5	1	0.60 Rf	3.7 AU	0.64 Rf	102.1 AU	100.00 %	0.66 Rf	0.1 AU	2153.4 AU	100.00 %	AutoGenerated3
6	1	0.60 Rf	8.9 AU	0.64 Rf	117.4 AU	100.00 %	0.65 Rf	0.3 AU	2220.0 AU	100.00 %	AutoGenerated3

Konsentrasi Nikotin	Area (x)	$x - \bar{x}$
70 ppm	2285,0	24,2833
70 ppm	2153,4	-107.317
70 ppm	2220,0	-40.7167
70 ppm	2532.5	271.783
70 ppm	2153,4	-107.317
70 ppm	2220,0	-40.7167

$$\bar{x} = \frac{13564.3}{6} = 2260,7$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} = 141,989$$

$$SBR = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% = \frac{141,9896}{2260,7} = 6,2807\%$$

$$\frac{2}{3} CV \text{ Horwitz} = \frac{2}{3} \times 2^{1-(0,5 \times \log C)}$$

$$= \frac{2}{3} \times 2^{1-(0,5 \times \log(70 \times 10^{-6}))}$$

$$= \frac{2}{3} \times 2^{1-(0,5 \times (-5,155))}$$

$$= \frac{2}{3} \times 2^{3,5775}$$

$$= \frac{2}{3} \times 11,938 = 7,958$$

Keterangan : C = rata-rata konsentrasi analit

- Data Scanning dengan *TLC Scanner* Larutan Standar Nikotin 100 ppm (n = 6)

Track	Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	1	0.60 Rf	0.0 AU	0.65 Rf	65.2 AU	100.00 %	0.67 Rf	21.2 AU	4219.8 AU	100.00 %	AutoGenerated3
2	1	0.60 Rf	2.5 AU	0.64 Rf	121.9 AU	100.00 %	0.67 Rf	3.0 AU	4341.6 AU	100.00 %	AutoGenerated3
3	1	0.60 Rf	3.4 AU	0.64 Rf	120.4 AU	100.00 %	0.67 Rf	4.0 AU	4219.8 AU	100.00 %	AutoGenerated3
4	1	0.60 Rf	8.6 AU	0.64 Rf	118.0 AU	100.00 %	0.67 Rf	0.6 AU	4123.5 AU	100.00 %	AutoGenerated3
5	1	0.60 Rf	3.1 AU	0.64 Rf	123.9 AU	100.00 %	0.67 Rf	0.6 AU	4506.1 AU	100.00 %	AutoGenerated3
6	1	0.60 Rf	1.6 AU	0.65 Rf	100.2 AU	100.00 %	0.67 Rf	6.4 AU	4341.6 AU	100.00 %	AutoGenerated3

Konsentrasi Nikotin	Area (x)	$x - \bar{x}$
100 ppm	4219.8	-72.2667
100 ppm	4341.6	49.5333
100 ppm	4219.8	-72.2667
100 ppm	4123.5	-168.567
100 ppm	4506.1	214.033
100 ppm	4341.6	49.5333

$$\bar{x} = \frac{25752,4}{6} = 4292,1$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{n-1}} = 133,848$$

$$SBR = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% = \frac{133,848}{4292,1} = 3,1185\%$$

$$\begin{aligned} \frac{2}{3} CV \text{ Horwitz} &= \frac{2}{3} \times 2^{1-(0,5 \times \log C)} \\ &= \frac{2}{3} \times 2^{1-(0,5 \times \log(100 \times 10^{-6}))} \\ &= \frac{2}{3} \times 2^{1-(0,5 \times (-5,000))} \\ &= \frac{2}{3} \times 2^{3,500} \\ &= \frac{2}{3} \times 11,314 = 7,542 \end{aligned}$$

Keterangan : C = rata-rata konsentrasi analit

**LAMPIRAN F. DATA PENENTUAN KADAR NIKOTIN DALAM
BATANG TEMBAKAU**

Pengulangan Ke-	Area (AU)
1	3441,1
2	3960,8
3	3818,8

- Persamaan Garis Kurva Kalibrasi: $y = 3,486x - 551,8$
- Kadar Air rata-rata yang diperoleh = 8,5 %, Jadi sampel kering serbuk batang tembakau sebesar 0,915 gram dari 1 gram sampel basah serbuk batang tembakau.
- Dalam 1 kg batang tembakau segar didapat 250 gram batang tembakau kering.

1. Kadar Nikotin Pada Sampel Ulangan 1

- Massa Nikotin Hasil Pengukuran

$$3441,1 = 3,486x - 551,8$$

$$3992,9 = 3,486x$$

$$x = 1145,4 \text{ ng}$$

- Konsentrasi Nikotin Hasil Pengukuran

$$\frac{\text{Massa nikotin hasil pengukuran}}{\text{volume penotolan}} = \frac{1145,4 \text{ ng}}{20 \mu\text{L}} = 57,27 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

- Konsentrasi Nikotin Dengan Pengenceran 5 kali

$$\begin{aligned} \frac{\text{Massa nikotin hasil pengukuran}}{\text{volume penotolan}} \times fp &= \frac{1145,4 \text{ ng}}{20 \mu\text{L}} \times 5 \\ &= 286,35 \text{ ng}/\mu\text{L} \end{aligned}$$

- Massa Nikotin

$$\text{Konsentrasi nikotin} \times \text{volume total ekstraksi}$$

$$= 286,35 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 5000 \mu\text{L} = 1431,750 \times 10^3 \text{ ng}$$

- Kadar Nikotin (*Wet Basis*)

$$\begin{aligned}\frac{\text{massa nikotin}}{\text{massa sampel}} &= \frac{1431,750 \times 10^3 \text{ ng}}{10 \text{ g}} = \frac{1431,750 \times 10^{-3} \text{ mg}}{1 \times 10^{-2} \text{ kg}} \\ &= 1431,750 \times 10^{-1} \text{ mg/kg} = 143,175 \text{ mg/kg}\end{aligned}$$

- Kadar Nikotin (*Dry Basis*)

$$\begin{aligned}\frac{\text{massa nikotin}}{\text{massa sampel}} &= \frac{1431,750 \times 10^3 \text{ ng}}{9,915 \text{ g}} = \frac{1431,750 \times 10^{-3} \text{ mg}}{9,915 \times 10^{-3} \text{ kg}} \\ &= 144,402 \text{ mg/kg}\end{aligned}$$

- Kadar nikotin dalam 1 kg Batang Tembakau Segar

$$\begin{aligned}\frac{\text{massa nikotin}}{\text{massa sampel}} &= \frac{1431,750 \times 10^3 \text{ ng}}{1000 \text{ gram}} = \frac{1431,750 \times 10^{-3} \text{ mg}}{1,00 \text{ kg}} \\ &= 1,432 \text{ mg/kg}\end{aligned}$$

2. Kadar Nikotin Pada Sampel Ulangan 2

- Massa Nikotin Hasil Pengukuran

$$3960,8 = 3,486x - 551,8$$

$$4512,6 = 3,486x$$

$$x = 1294,5 \text{ ng}$$

- Konsentrasi Nikotin Hasil Pengukuran

$$\frac{\text{Massa nikotin hasil pengukuran}}{\text{volume penotolan}} = \frac{1294,5 \text{ ng}}{20 \mu\text{L}} = 64,72 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

- Konsentrasi Nikotin Dengan pengenceran 5 kali

$$\frac{\text{Massa nikotin hasil pengukuran}}{\text{volume penotolan}} \times fp = \frac{1294,5 \text{ ng}}{20 \mu\text{L}} \times 5 = 323,6 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

- Massa Nikotin

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi nikotin} \times \text{volume total ekstraksi} \\ = 323,6 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 5000 \mu\text{L} = 1618,000 \times 10^3 \text{ ng}\end{aligned}$$

- Kadar Nikotin (*Wet Basis*)

$$\begin{aligned}\frac{\text{massa nikotin}}{\text{massa sampel}} &= \frac{1618,000 \times 10^3 \text{ ng}}{10 \text{ g}} = \frac{1618,000 \times 10^{-3} \text{ mg}}{1 \times 10^{-2} \text{ kg}} \\ &= 1618,000 \times 10^{-1} \text{ mg/kg} = 161,800 \text{ mg/kg}\end{aligned}$$

- Kadar Nikotin (*Dry Basis*)

$$\begin{aligned}\frac{\text{massa nikotin}}{\text{massa sampel}} &= \frac{1618,000 \times 10^3 \text{ ng}}{9,915 \text{ gram}} = \frac{1618,000 \times 10^{-3} \text{ mg}}{9,915 \times 10^{-3} \text{ kg}} \\ &= 163,187 \text{ mg/kg}\end{aligned}$$

- Kadar nikotin dalam 1 kg Batang Tembakau Segar

$$\begin{aligned}\frac{\text{massa nikotin}}{\text{massa sampel}} &= \frac{1618,000 \times 10^3 \text{ ng}}{1000 \text{ gram}} = \frac{1618,000 \times 10^{-3} \text{ mg}}{1,00 \text{ kg}} \\ &= 1,618 \text{ mg/kg}\end{aligned}$$

3. Kadar Nikotin Pada Sampel Ulangan 3

- Massa Nikotin Hasil Pengukuran

$$3818,8 = 3,486x - 551,8$$

$$4370,6 = 3,486x$$

$$x = 1253,8 \text{ ng}$$

- Konsentrasi Nikotin Hasil Pengukuran

$$\frac{\text{Massa nikotin hasil pengukuran}}{\text{volume penotolan}} = \frac{1253,8 \text{ ng}}{20 \mu\text{L}} = 62,69 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

- Konsentrasi Nikotin Dengan Pengenceran 5 kali

$$\begin{aligned}\frac{\text{Massa nikotin hasil pengukuran}}{\text{volume penotolan}} \times fp &= \frac{1253,8 \text{ ng}}{20 \mu\text{L}} \times 5 \\ &= 313,45 \text{ ng}/\mu\text{L}\end{aligned}$$

- Massa Nikotin

Konsentrasi nikotin × *volume total ekstraksi*

$$= 313,45 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 5000 \mu\text{L} = 1567,250 \times 10^3 \text{ ng}$$

- Kadar Nikotin (*Wet Basis*)

$$\begin{aligned} \frac{\text{massa nikotin}}{\text{massa sampel}} &= \frac{1567,250 \times 10^3 \text{ ng}}{10 \text{ g}} = \frac{1567,250 \times 10^{-3} \text{ mg}}{1 \times 10^{-2} \text{ kg}} \\ &= 1567,250 \times 10^{-1} \text{ mg}/\text{kg} = 156,725 \text{ mg}/\text{kg} \end{aligned}$$

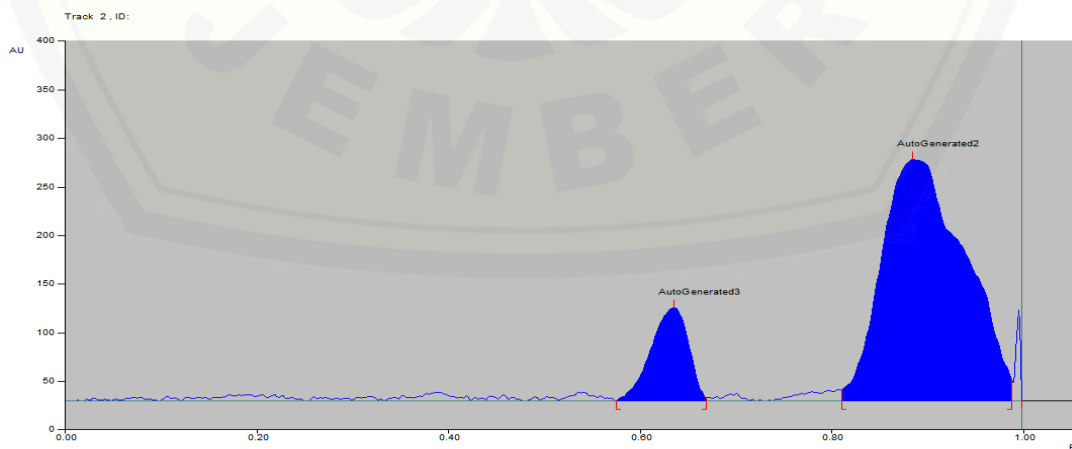
- Kadar Nikotin (*Dry Basis*)

$$\begin{aligned} \frac{\text{massa nikotin}}{\text{massa sampel}} &= \frac{1567,250 \times 10^3 \text{ ng}}{9,915 \text{ g}} = \frac{1567,250 \times 10^{-3} \text{ mg}}{9,915 \times 10^{-3} \text{ kg}} \\ &= 158,069 \text{ mg}/\text{kg} \end{aligned}$$

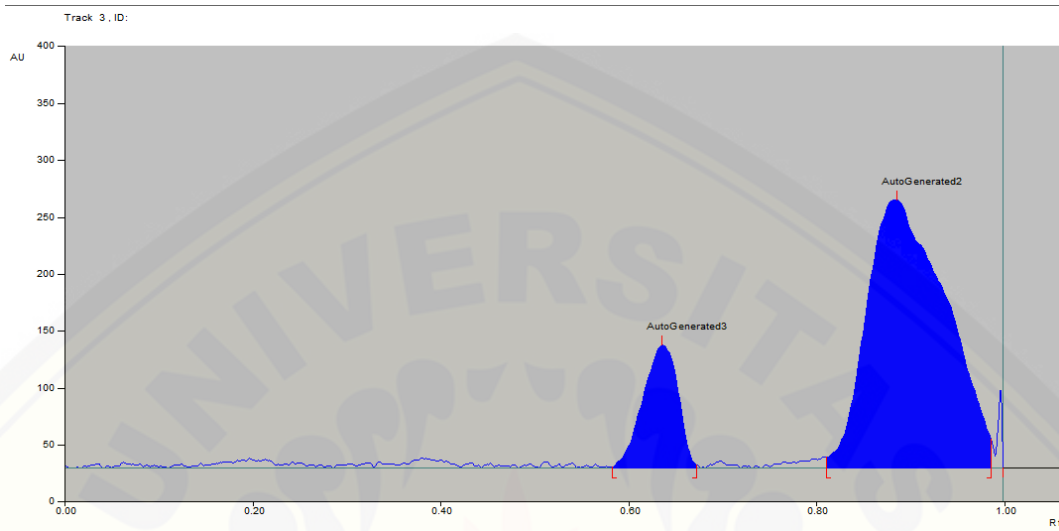
- Kadar nikotin dalam 1 kg Batang Tembakau Segar

$$\begin{aligned} \frac{\text{massa nikotin}}{\text{massa sampel}} &= \frac{1567,250 \times 10^3 \text{ ng}}{1000 \text{ gram}} = \frac{1576,250 \times 10^{-3} \text{ mg}}{1,00 \text{ kg}} \\ &= 1,576 \text{ mg}/\text{kg} \end{aligned}$$

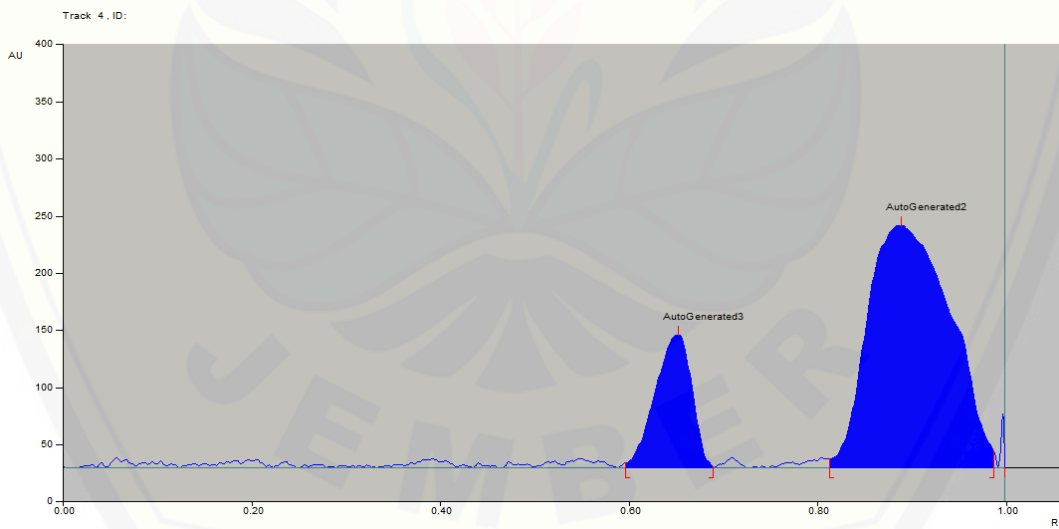
▪ **Data Densitogram Sampel Nikotin Dalam Ekstrak Batang Tembakau Pengulangan 1**



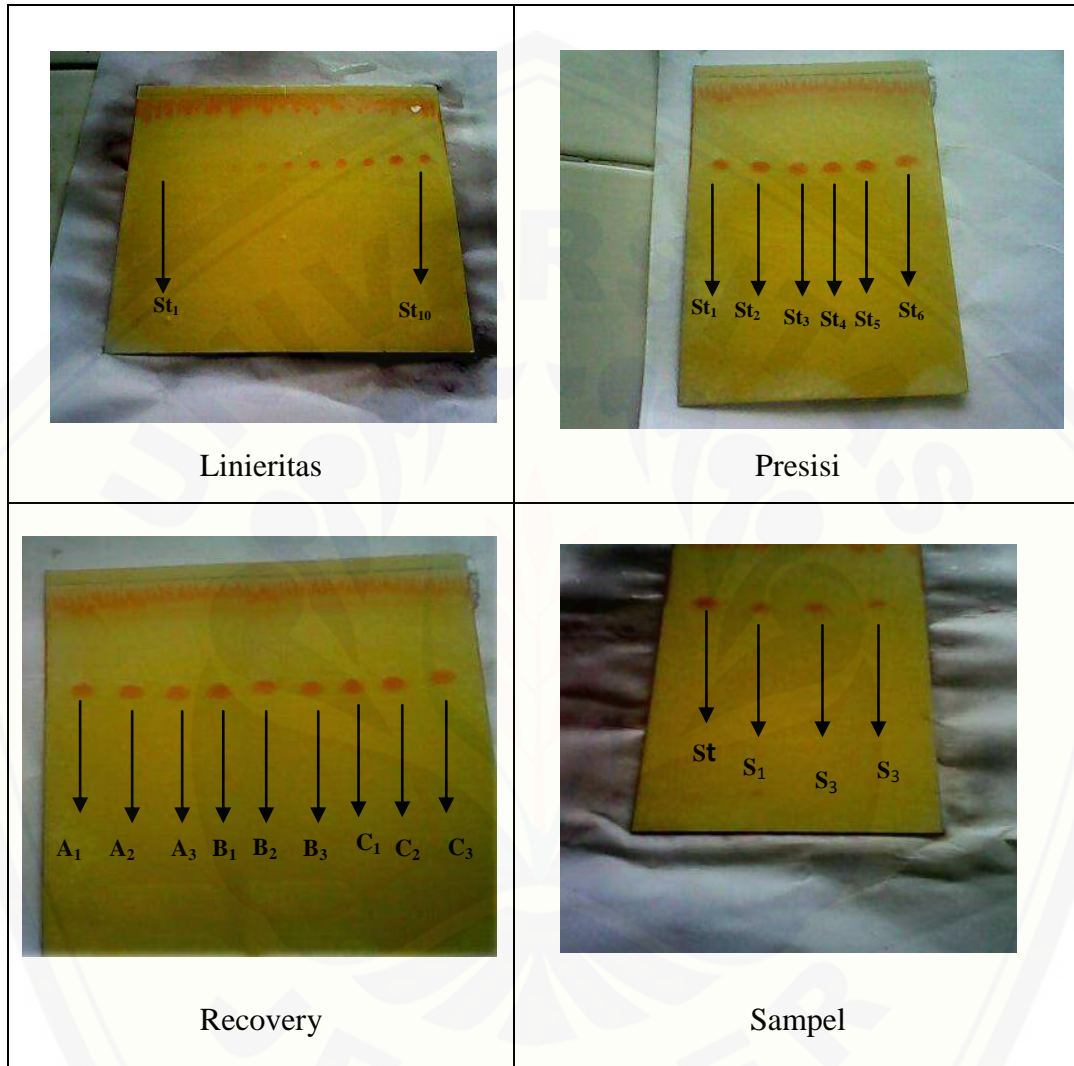
Pengulangan 2



Pengulangan 3



LAMPIRAN G. GAMBAR KROMATOGRAM VALIDASI METODE



Keterangan : A = Standar Nikotin
 B = Standar + Sampel
 C = Sampel
 St = Standar Nikotin
 S = Sampel