



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS KATEKIN DAN EPIKATEKIN
DALAM HASIL OLAHAN BIJI KAKAO
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
DENGAN DETEKTOR ULTRAVIOLET**

SKRIPSI

**TAUFIQ INDRA RUKMANA
0606029214**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS KATEKIN DAN EPIKATEKIN
DALAM HASIL OLAHAN BIJI KAKAO
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
DENGAN DETEKTOR ULTRAVIOLET**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**TAUFIQ INDRA RUKMANA
0606029214**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Taufiq Indra Rukmana

NPM : 0606029214

Tanda Tangan :

Tanggal : 13 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Taufiq Indra Rukmana
NPM : 0606029214
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Analisis Katekin dan Epikatekin dalam Hasil Olahan Biji Kakao secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan Detektor Ultraviolet

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Herman Suryadi, MS.

Pembimbing II : Dr. Harmita, Apt.

Penguji I : Dra. Rosmala Dewi, Apt.

Penguji II : Dr. Maksun Radji, M. Biomed.

Penguji III : Dr. Arry Yanuar, MS.



(
(
(
(
(

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 13 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur dipanjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan nikmat, rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini tepat waktu. Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Dr. Herman Suryadi, MS. selaku pembimbing I atas kesabarannya dalam membimbing penulis, memberikan petunjuk dan memberikan banyak sekali masukan selama penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Bapak Dr. Harmita, Apt. selaku pembimbing II atas kesabarannya dalam membimbing penulis, memberikan petunjuk dan memberikan banyak sekali masukan selama penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.
4. Ibu Santi Purna Sari, S.Si., M.Si selaku pembimbing akademik yang telah memberikan banyak perhatian, saran, dan bantuannya selama ini.
5. Seluruh dosen Departemen Farmasi FMIPA UI atas segala ilmu pengetahuan dan didikannya selama ini.
6. Bapak Drs. Subagja, M.Si. atas bantuan yang diberikan baik berupa bahan-bahan maupun saran sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.
7. Keluarga yang telah membesarkan penulis, khususnya Ayahanda Sugeng Rahmat Rahardjo dan Ibunda Sunarlin atas segenap kasih sayang serta motivasi yang tak ternilai harganya. Tidak lupa pula kepada adik tercinta Wisnu Choirul Ilham yang selalu membuat saya semangat dalam mengerjakan penelitian.
8. Rekan-rekan mahasiswa Farmasi 2006 atas persaudaraan yang terbina indah selama ini, terutama kepada seluruh penghuni Laboratorium Kimia Kuantitatif lantai 3. Tak lupa kepada teman-teman penelitian Laboratorium

Farmasetika atas segenap bantuannya secara langsung selama proses penelitian; Kakak angkat penulis, Kak Raditya Iswandana, atas arahan-arahannya dalam menempuh pendidikan di Farmasi UI, terima kasih atas segenap bantuan, pinjaman buku serta diktat kuliah yang sangat membantu penulis selama menempuh studi di Farmasi; Bapak/ibu, mas/mbak, adik-adik, serta saudara-saudara satu perjuangan asal Jombang dan kos-kosan Wisma Sakinah atas bantuan, persahabatan, motivasi, dan dukungannya kepada penulis selama tinggal dan kuliah di Depok.

9. Seluruh laboran dan karyawan Dept. Farmasi FMIPA UI terutama kepada Bapak Rustam, Bapak Suroto, dan Bapak Ma'ruf atas seluruh waktu dan bantuannya, terutama selama proses penelitian.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis akan senang hati menerima segala kritik dan saran demi tercapainya hasil yang lebih baik lagi. Tak ada yang penulis harapkan selain sebuah keinginan agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan ilmu Farmasi pada khususnya.

Penulis
2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Taufiq Indra Rukmana
NPM : 0606029214
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Analisis Katekin dan Epikatekin dalam Hasil Olahan Biji Kakao secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan Detektor Ultraviolet.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 13 Juli 2010

Yang menyatakan



(Taufiq Indra Rukmana)

ABSTRAK

Nama : Taufiq Indra Rukmana
Program Studi : Farmasi
Judul : Analisis Katekin dan Epikatekin dalam Hasil Olahan Biji Kakao secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan Detektor Ultraviolet

Kakao dan produk olahannya memiliki kandungan flavonoid yang tinggi, terutama katekin dan epikatekin. Flavonoid bermanfaat bagi kesehatan manusia antara lain sebagai antioksidan, antikanker, antiinflamasi, serta kesehatan kardiovaskuler. Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh kondisi optimum analisis katekin dan epikatekin dalam hasil olahan biji kakao secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor ultraviolet. Kondisi analisis optimum adalah menggunakan fase diam kolom C-18, fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit, dan panjang gelombang 280 nm. Hasil validasi analisis katekin dan epikatekin menunjukkan linearitas yang baik masing-masing pada konsentrasi 2-40 ppm dan 20-160 ppm; batas kuantitasi masing-masing 1,33 ppm dan 12,45 ppm; relatif standar deviasi untuk pengukuran < 2 %. Penerapan metode ini terhadap sampel hasil olahan biji kakao didapatkan hasil berturut-turut katekin dan epikatekin adalah 1,61 µg/mg dan 3,71 µg/mg (nib kakao); 3,01 µg/mg dan 6,71 µg/mg (pasta kakao); serta 3,76 µg/mg dan 7,63 µg/mg (bubuk kakao).

Kata kunci : analisis, epikatekin, kakao, katekin, KCKT, validasi
xvi+86 halaman : 27 gambar; 12 tabel; 8 lampiran
Daftar acuan : 24 (1987-2009)

ABSTRACT

Name : Taufiq Indra Rukmana
Program Study: Pharmacy
Title : Analysis of Catechin and Epicatechin in Cocoa Beans Products
by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet
Detector

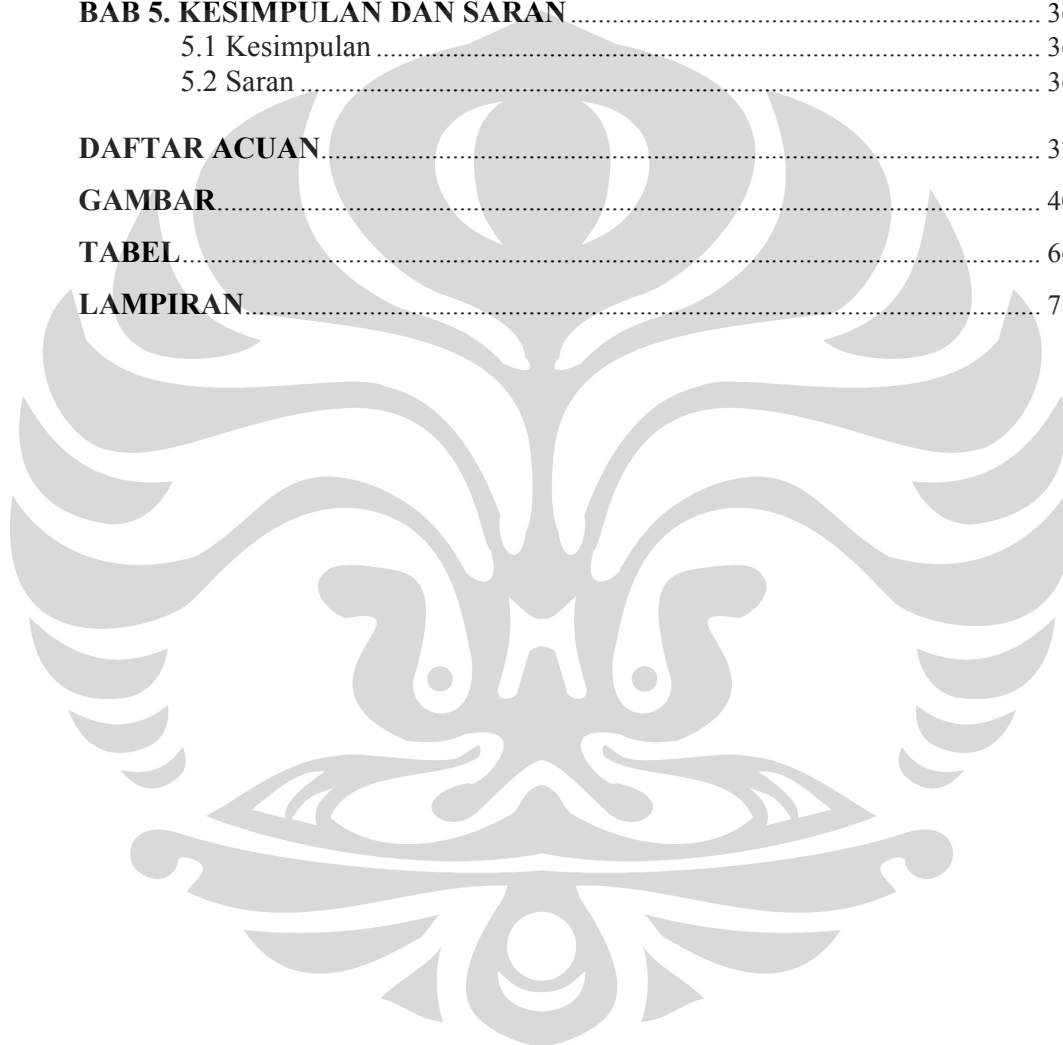
Cocoa and its products have a high content of flavonoids, particularly catechin and epicatechin. Flavonoids are beneficial to human health such as antioxidant, anticancer, antiinflammatory, and cardiovascular health. This research was conducted to obtain optimum analysis condition of catechin and epicatechin in cocoa beans products by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with ultraviolet detector. The optimum analysis conditions is to use the stationary phase C-18 column, mobile phase water-acetonitrile-4 % trifluoroacetic acid (90:10:1, v/v/v), flow rate 1,0 ml/minute, and wavelength 280 nm. The validation analysis of catechin and epicatechin showed good linearity each in the concentration of 2-40 ppm and 20-160 ppm; respectively quantitation limit was 1,33 ppm and 12,45 ppm; relative standard deviation for the measurement was less than 2 %. Application of this method on samples of cocoa beans products showed that concentration of catechin and epicatechin in a row were 1,61 µg/mg and 3,71 µg/mg (cocoa nib); 3,01 µg/mg and 6,71 µg/mg (cocoa paste); and 3,76 µg/mg and 7,63 µg/mg (cocoa powder).

Keywords : analysis, catechin, cocoa, epicatechin, HPLC, validation
xvi+86 pages : 27 figures; 12 tables; 8 appendices
Bibliography : 24 (1987-2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Klasifikasi Kakao	3
2.2 Tanaman Kakao di Indonesia	3
2.3 Senyawa Aktif yang Terdapat dalam Biji Kakao.....	4
2.4 Manfaat Kesehatan Biji Kakao.....	6
2.5 Pengolahan Biji Kakao.....	9
2.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	10
2.6 Validasi Metode Analisis.....	14
2.5 Metode Analisis Katekin dan Epikatekin.....	16
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	20
3.1 Tempat dan Waktu.....	20
3.2 Alat	20
3.3 Bahan	20
3.4 Cara Kerja.....	21
3.4.1 Pembuatan Larutan Induk Katekin dan Epikatekin.....	21
3.4.2 Pemilihan Kondisi Analisis Penetapan Kadar Katekin dan Epikatekin.....	21
3.4.3 Validasi Metode Analisis Katekin dan Epikatekin.....	22
3.4.4 Ekstraksi dan Analisis Katekin dan Epikatekin dalam Sampel	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
4.1 Pembuatan Larutan Induk Katekin dan Epikatekin	25
4.2 Pemilihan Kondisi Analisis Penetapan Kadar Katekin dan Epikatekin	25

4.3 Uji Spesifitas dan Selektivitas.....	29
4.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas Katekin dan Epikatekin.....	29
4.5 Pengukuran Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Katekin dan Epikatekin.....	30
4.6 Uji Presisi dan Uji Perolehan Kembali Katekin dan Epikatekin.....	31
4.7 Ekstraksi dan Analisis Katekin dan Epikatekin dalam Sampel.....	33
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	36
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran.....	36
DAFTAR ACUAN.....	37
GAMBAR.....	40
TABEL.....	66
LAMPIRAN.....	78

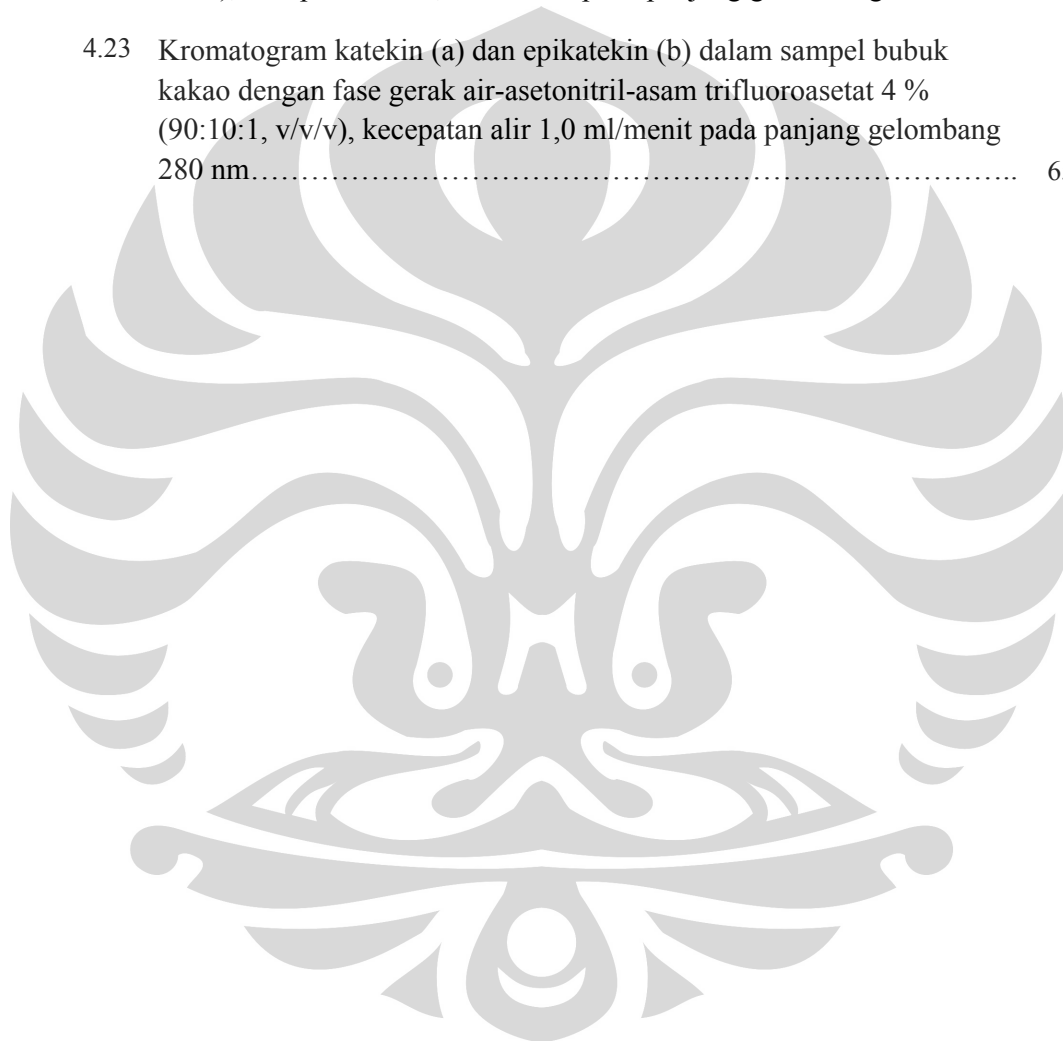


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Senyawa polifenol utama yang terdapat dalam biji kakao.....	5
3.1 Alat kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu)	40
3.2 Alat spektrofotometer UV-Vis Jasco V-630	41
3.3 Alat yang digunakan untuk mengolah biji kakao.....	42
4.1 Kromatogram katekin 103,95 ppm dalam pelarut metanol 30 % pada kondisi analisis optimum.....	43
4.2 Kromatogram epikatekin 100,416 ppm dalam pelarut metanol 30 % pada kondisi analisis optimum.....	44
4.3 Spektrum serapan katekin 100 ppm dalam pelarut metanol 30 %.....	45
4.4 Spektrum serapan epikatekin 100 ppm dalam pelarut metanol 30 %.....	46
4.5 Gambar 4.5 : Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 278 nm.....	47
4.6 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 279 nm.....	48
4.7 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm.....	49
4.8 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (95:5:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm.....	50

4.9	Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm.....	51
4.10	Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (85:15:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm.....	52
4.11	Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 0,8 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm.....	53
4.12	Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm.....	54
4.13	Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,2 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm.....	55
4.14	Kromatogram larutan metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm	56
4.15	Kurva kalibrasi katekin	57
4.16	Kurva kalibrasi epikatekin	58
4.17	Kromatogram larutan katekin 12 ppm dan epikatekin 160 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit, panjang gelombang 280 nm.....	59
4.18	Sampel biji kakao yang mengandung katekin dan epikatekin.....	60
4.19	Hasil olahan biji kakao yang mengandung katekin dan epikatekin.....	61

4.20 Hasil ekstraksi biji kakao yang mengandung katekin dan epikatekin.....	62
4.21 Kromatogram katekin (a) dan epikatekin (b) dalam sampel nib kakao dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm...	63
4.22 Kromatogram katekin (a) dan epikatekin (b) dalam sampel pasta kakao dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm...	64
4.23 Kromatogram katekin (a) dan epikatekin (b) dalam sampel bubuk kakao dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm.....	65

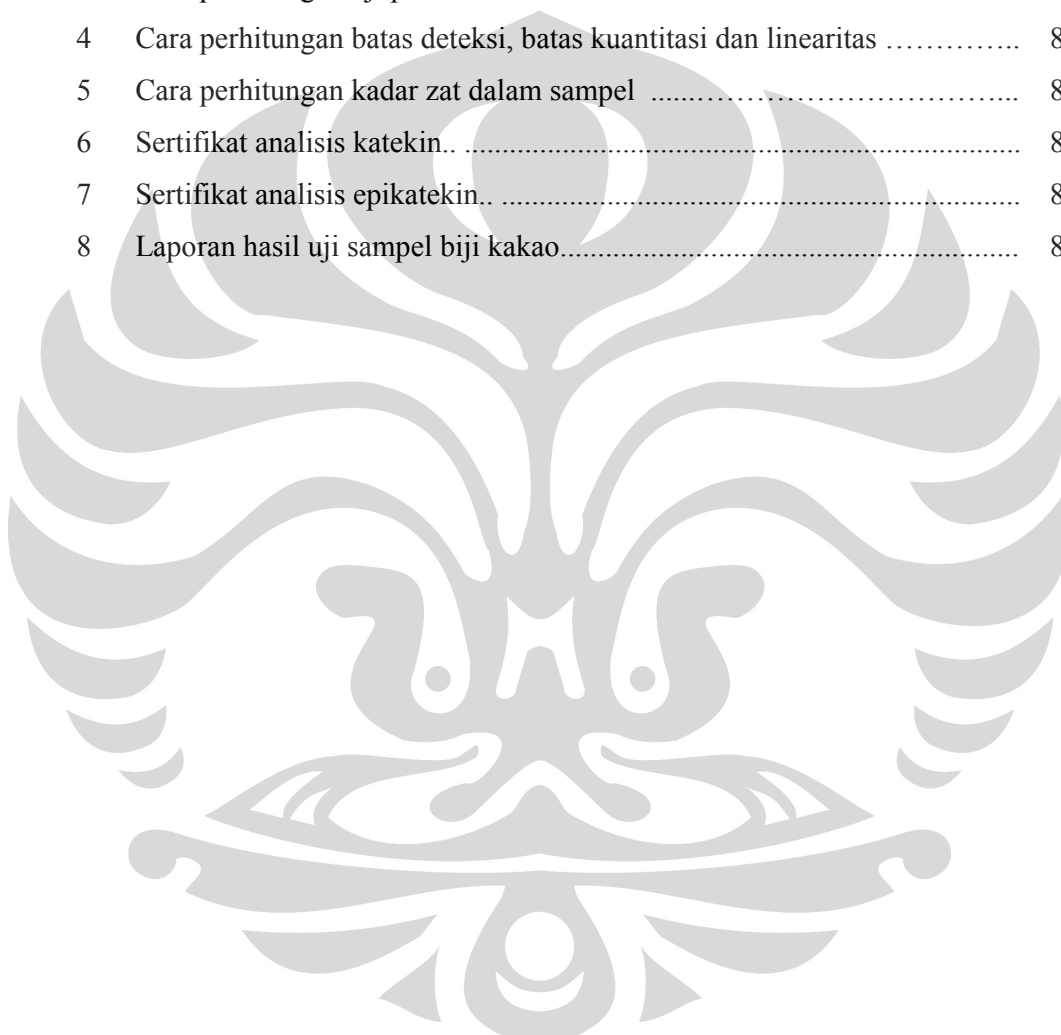


DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak.....	21
4.1 Data waktu retensi, area, ukuran efisiensi kolom, dan jumlah pelat teoritis katekin dan epikatekin pada berbagai kondisi.....	66
4.2 Data kurva kalibrasi dan linearitas katekin.....	68
4.3 Data kurva kalibrasi dan linearitas epikatekin.....	69
4.4 Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi katekin.....	70
4.5 Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi epikatekin.....	71
4.6 Data hasil uji presisi katekin.....	72
4.7 Data hasil uji presisi epikatekin.....	73
4.8 Data hasil uji perolehan kembali katekin.....	74
4.9 Data hasil uji perolehan kembali epikatekin.....	75
4.10 Hasil penetapan kadar katekin pada sampel.....	76
4.11 Hasil penetapan kadar epikatekin pada sampel.....	77

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Cara memperoleh persamaan regresi linier	78
2 Cara perhitungan uji presisi	79
3 Cara perhitungan uji perolehan kembali	80
4 Cara perhitungan batas deteksi, batas kuantitasi dan linearitas	81
5 Cara perhitungan kadar zat dalam sampel	82
6 Sertifikat analisis katekin.....	83
7 Sertifikat analisis epikatekin.....	84
8 Laporan hasil uji sampel biji kakao.....	85



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) memang bukan tanaman asli Indonesia, yaitu diperkirakan berasal dari lembah hulu sungai Amazon, Amerika Selatan (Goenadi, Baon, Herman, Purwoto, dan Suryana; 2005). Namun demikian, Indonesia menempatkan diri sebagai produsen kakao terbesar ketiga dunia setelah Pantai Gading (Cote d'Ivoire) dan Ghana (FAO, 2005).

Pemerintah melakukan berbagai upaya untuk meningkatkan produktivitas kakao Indonesia. Sejak awal tahun 2009 pemerintah mencanangkan program Gerakan Nasional (Gernas) Peningkatan Produksi dan Mutu Kakao. Dalam Gernas Kakao pemerintah melakukan tiga kegiatan yakni rehabilitasi, peremajaan dan intensifikasi. Pemerintah berharap dalam waktu tiga tahun mendatang, produktivitas tanaman kakao secara nasional minimal bisa mencapai 1,5 ton/ha (Perluas Areal Tanaman Kakao di Indonesia Barat, 2009).

Kakao dan produk olahannya memiliki kandungan senyawa flavonoid yang tinggi. Flavonoid bermanfaat bagi kesehatan manusia karena perannya antara lain sebagai antioksidan, antikanker, antiinflamasi, serta kesehatan kardiovaskuler (Wollgast, 2004).

Flavonoid merupakan golongan polifenol yang banyak terdapat pada buah-buahan, sayuran, teh, anggur merah, dan kakao. Kakao dan produk coklat memiliki konsentrasi flavonoid tertinggi di antara makanan-makanan yang umum dikonsumsi. Lebih dari 10 % berat bubuk kakao adalah flavonoid yang sebagian besar berupa prosianidin, katekin, dan epikatekin. Biasanya senyawa flavonoid tersebut terdapat dalam monomer, dimer, trimer, maupun oligomer (Roy, Lundy, dan Brantley, 2005). Total senyawa polifenol yang terdapat dalam biji kakao kering yang telah bebas lemak berkisar antara 15-20 % atau setara dengan sekitar 6 % biji kakao segar yang dikering-anginkan (dengan kandungan lemak 54 % dan kandungan air 6 %) dan sekitar 5 % pada biji kakao yang telah difermentasi (Wollgast, 2004). Hasil penelitian lain menyebutkan bahwa kandungan polifenol

yang terdapat dalam kakao yang telah dihilangkan lemaknya berkisar antara 12-18 %. (+)-Katekin, (-)-epikatekin, dan prosianidin (60 % tersusun dalam bentuk dimer) merupakan senyawa utama dari kelompok polifenol tersebut (Brito, Garcia, dan Amancio, 2002).

Pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya dapat mempengaruhi kandungan katekin dan epikatekin yang ada di dalamnya. Proses pengolahan biji kakao dapat memicu reaksi epimerisasi dari (-)-epikatekin menjadi (-)-katekin. Akibatnya kandungan epikatekin dalam kakao akan berkurang sementara kandungan katekin akan bertambah (Kofink, Papagiannopoulos, dan Galensa, 2007). Padahal ditinjau dari segi manfaatnya terhadap kesehatan, zat yang dapat memberikan manfaat yang lebih besar, secara *in vitro*, adalah (-)-epikatekin.

Mengingat komponen kimia yang terdapat dalam biji kakao cukup banyak, sementara zat standar yang ada di pasaran terbatas dan harganya relatif mahal, serta alat yang memadai untuk analisis juga terbatas, maka diperlukan metode yang mudah dan sederhana untuk menganalisis kandungan kimia dalam biji kakao beserta produk olahannya. Metode analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor ultraviolet diharapkan mampu mengatasi keterbatasan-keterbatasan tersebut. Metode analisis menggunakan detektor ultraviolet tersebut memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, terutama terhadap senyawa-senyawa yang memiliki gugus kromofor (Harmita, 2006a), sehingga diharapkan dapat digunakan untuk analisis katekin dan epikatekin.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah : (1) Melakukan optimasi kondisi analisis senyawa katekin dan epikatekin menggunakan KCKT dengan detektor ultraviolet. (2) Melakukan validasi metode analisis senyawa katekin dan epikatekin menggunakan KCKT dengan detektor ultraviolet. (3) Menganalisis senyawa katekin dan epikatekin yang terdapat dalam hasil olahan biji kakao menggunakan KCKT dengan detektor ultraviolet.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi Kakao

Kakao atau lebih dikenal di Indonesia sebagai coklat merupakan produk yang dihasilkan dari biji kakao. Tanaman kakao mempunyai nama Latin *Theobroma cacao* L. Adapun klasifikasi tanaman kakao secara taksonomi adalah sebagai berikut (Jones, Samuel, dan Luchsinger, 1987):

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
Sub Kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculiaceae
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> L.

2.2 Tanaman Kakao di Indonesia

Tanaman kakao bukan tanaman asli Indonesia. Tanaman tersebut diperkirakan berasal dari lembah hulu sungai Amazon, Amerika Selatan yang dibawa masuk ke Indonesia melalui Sulawesi Utara oleh Bangsa Spanyol sekitar tahun 1560 (Goenadi, Baon, Herman, Purwoto, dan Suryana, 2005).

Kakao merupakan salah satu komoditas andalan perkebunan yang peranannya cukup penting bagi perekonomian nasional, khususnya sebagai penyedia lapangan kerja, sumber pendapatan dan devisa negara, serta mendorong pengembangan wilayah dan pengembangan agroindustri. Pada tahun 2002, perkebunan kakao telah menyediakan lapangan kerja dan sumber pendapatan bagi sekitar 900 ribu kepala keluarga petani yang sebagian besar berada di Kawasan Timur Indonesia (KTI) serta memberikan sumbangan devisa terbesar ke-3 sub

sektor perkebunan setelah karet dan minyak sawit dengan nilai sebesar US \$ 701 juta (Goenadi, Baon, Herman, Purwoto, dan Suryana, 2005).

Perkebunan kakao di Indonesia mengalami perkembangan pesat dalam kurun waktu 20 tahun terakhir dan pada tahun 2002 areal perkebunan kakao Indonesia tercatat seluas 914.051 ha. Perkebunan kakao tersebut sebagian besar (87,4 %) dikelola oleh rakyat dan selebihnya 6,0 % dikelola perkebunan besar negara serta 6,7 % perkebunan besar swasta (Goenadi, Baon, Herman, Purwoto, dan Suryana; 2005). Bahkan, pada tahun 2005 Indonesia menempatkan diri sebagai produsen kakao terbesar ketiga dunia setelah Pantai Gading (Cote d'Ivoire) dan Ghana (FAO, 2005).

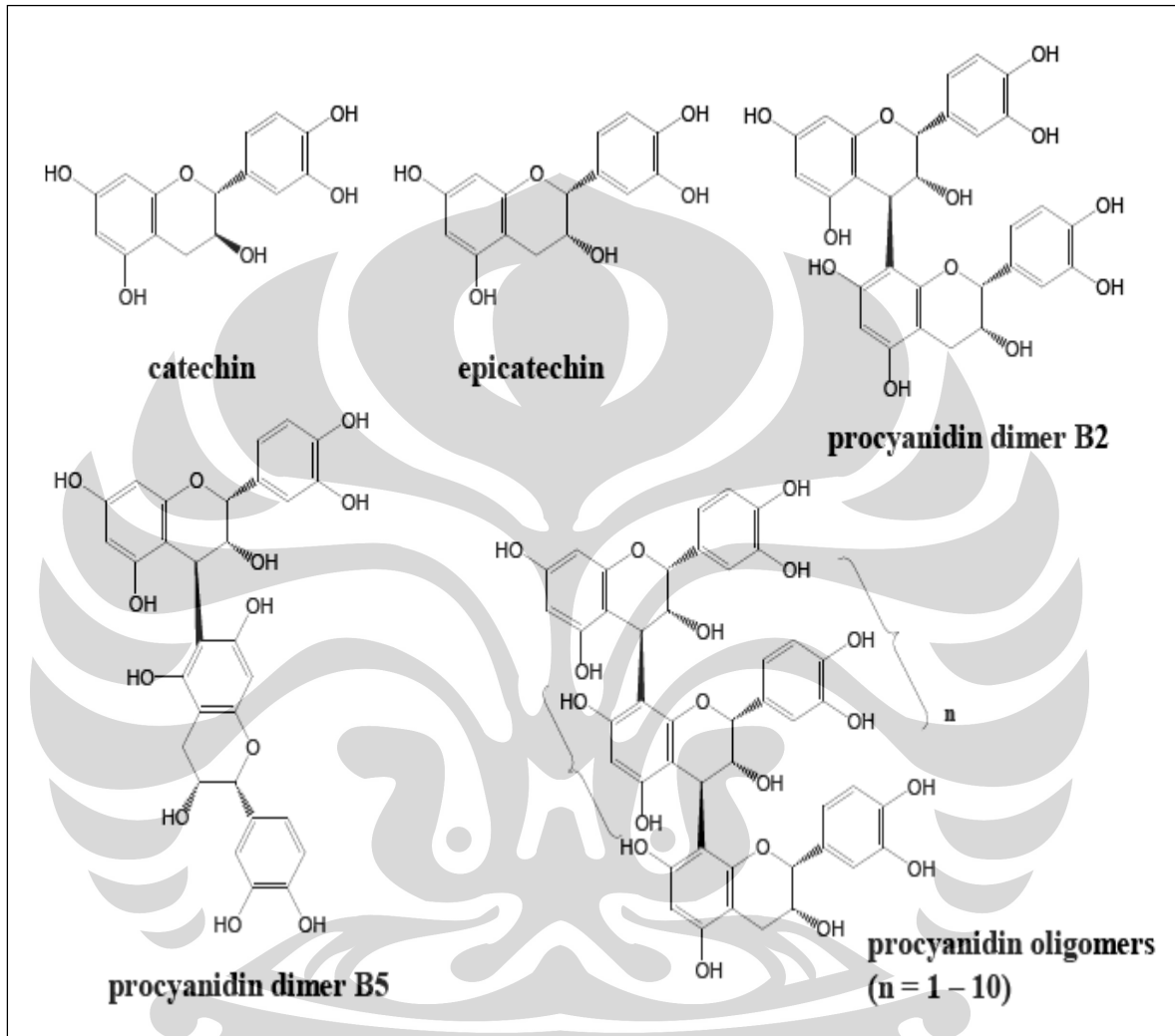
Tanaman kakao ditanam hampir di seluruh pelosok tanah air dengan sentra produksi utama adalah Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, Sulawesi Tengah, Sumatera Utara, Nusa Tenggara Timur, Jawa Timur, Kalimantan Timur, Maluku Utara dan Irian Jaya (Goenadi, Baon, Herman, Purwoto, dan Suryana, 2005).

Selain di Kawasan Timur Indonesia, Departemen Pertanian juga menargetkan penambahan areal perkebunan kakao di wilayah Indonesia Barat seluas 30.000 – 40.000 ha. Target tersebut diharapkan dapat tercapai selama periode tahun 2010-2014. Saat ini akibat banyak tanaman yang tua dan serangan hama, produktivitas tanaman hanya 600 kg/ha, padahal potensinya mencapai 1.100 kg/ha. Sejak awal tahun 2009 pemerintah mencanangkan program Gerakan Nasional (Gernas) Peningkatan Produksi dan Mutu Kakao. Dalam Gernas Kakao pemerintah melakukan tiga kegiatan yakni rehabilitasi, peremajaan dan intensifikasi. Pemerintah berharap dalam waktu tiga tahun mendatang, produktivitas tanaman kakao secara nasional minimal bisa mencapai 1,5 ton/ha (Perluas Areal Tanaman Kakao di Indonesia Barat, 2009).

2.3 Senyawa Aktif yang Terdapat dalam Biji Kakao

Zat-zat yang bermanfaat dalam biji kakao salah satunya adalah senyawa polifenol yang tersimpan dalam sel-sel pigmen kotiledon. Senyawa polifenol utama yang terkandung dalam biji kakao adalah katekin, epikatekin, dimer prosianidin B2, dimer prosianidin B5, dan bentuk oligomer prosianidin (Wollgast,

2004). Senyawa-senyawa tersebut memiliki struktur inti flavan-3-ol yang dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Senyawa polifenol utama yang terdapat dalam biji kakao

Selain itu, dalam biji kakao juga terdapat senyawa polifenol lain dalam jumlah sedikit. Senyawa polifenol tersebut adalah galokatekin dan epigalokatekin. Seperti halnya dengan polifenol utama, galokatekin dan epigalokatekin juga memiliki struktur inti flavan-3-ol. Biji kakao juga mengandung senyawa polifenol non flavan-3-ol, yaitu ada yang memiliki struktur inti flavonoid dan turunan asam hidroksi sinamat.

2.4 Manfaat Kesehatan Biji Kakao

Biji kakao mempunyai mempunyai cukup banyak manfaat bagi kesehatan manusia. Tulisan-tulisan yang menguraikan manfaat biji kakao yang telah banyak dimuat dalam berbagai jurnal ilmiah mengelompokkan manfaat kesehatan dari biji kakao ke dalam 4 kelompok (Wollgast, 2004), yaitu: 1) manfaat sebagai antioksidan, 2) manfaat yang berkaitan dengan kanker, 3) Manfaat yang berkaitan dengan kesehatan kardiovaskuler, dan 4) Manfaat yang berkaitan dengan respon imun dan antiinflamasi.

2.4.1 Manfaat sebagai antioksidan

Sifat antioksidan yang dimiliki oleh senyawa dengan struktur inti flavanol didasarkan atas struktur spesifik yang dimiliki oleh senyawa tersebut. Struktur spesifik yang dimaksud adalah gugus hidroksil pada cincin flavan (khususnya 3',4'-dihidroksi pada cincin B), panjang cincin oligomer, serta sifat stereokimia molekulnya. Adanya struktur spesifik itulah yang menyebabkan senyawa flavanol tersebut berfungsi sebagai zat antioksidan baik sebagai donor hidrogen (peredam radikal) maupun pengkelat ion logam (Keen, Holt, Oteiza, Fraga, dan Schmitz, 2005).

Kakao dan senyawa-senyawa flavanol serta prosianidin yang telah dimurnikan dari kakao dilaporkan mampu menahan laju oksidasi LDL (*Low Density Lipoprotein*) yang diperantarai oleh logam tembaga dan sel endotelial, mengurangi jumlah spesies oksigen relatif yang diaktifkan leukosit, melindungi eritrosit dari hemolisis, dan menghambat oksidasi DNA (Deoxyribose Nucleic Acid) yang diinduksi sinar ultraviolet C (UV-C). Dalam hal kemampuan menghambat oksidasi DNA yang diinduksi sinar UV-C, senyawa flavonoid yang terdapat dalam kakao sama efektifnya dengan vitamin C, E, dan glutathion. Yang menarik adalah baik kakao bubuk maupun ekstrak kakao memiliki kapasitas antioksidan yang lebih besar dibanding dengan bahan pangan lain yang kaya flavanol seperti teh hijau, teh hitam, anggur merah, bawang putih, dan strawberry (Keen, Holt, Oteiza, Fraga, dan Schmitz, 2005).

2.4.2 Manfaat yang berkaitan dengan kanker

Kerusakan oksidatif memiliki peran utama dalam hal timbulnya berbagai tahap karsinogenesis. Oleh karena itu, adanya sifat antioksidan yang dimiliki oleh kakao sebagaimana telah disebutkan sebelumnya memiliki andil dalam hal pencegahan timbulnya kanker (Wollgast, 2004).

Sifat antikarsinogenik ekstrak kakao telah diuji oleh menggunakan beberapa sel kanker manusia. Sepertinya hanya bentuk oligomer prosianidin, khususnya dengan 5 sampai 12 satuan monomer, yang menunjukkan efek antikarsinogenik tersebut. Di antara bentuk oligomer tadi, ternyata bentuk pentamer yang memiliki efek paling kuat. Diduga mekanisme antikarsinogenik dari prosianidin tersebut meliputi penghambatan pemecahan untai DNA, pembentukan ikatan silang antar protein DNA, oksidasi radikal bebas dari nukleotida yang berkaitan dengan sifat antioksidatifnya seperti halnya penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase 2 dan DNA topoisomerase. Lebih dari itu, senyawa prosianidin mengendalikan pembentukan oksida nitrat oleh makrofag, mempengaruhi oksida nitrat sintase yang dapat diinduksi (*inducible Nitric Oxide Synthase* = iNOS), dan dengan demikian mempengaruhi ribonuklease reduktase, suatu enzim yang mengubah ribonukleotida menjadi deoksiribonukleotida yang penting bagi sintesis DNA. Adanya hambatan pada sintesis DNA ini yang dapat menahan laju pembelahan sel tumor yang cepat (Romanczyk *et al.*, 1997).

2.4.3 Manfaat yang berkaitan dengan kesehatan kardiovaskuler

Salah satu penyebab timbulnya masalah kesehatan kardiovaskuler adalah karena ketidaklancaran aliran darah pada pembuluh kardiovaskuler. Ketidaklancaran tersebut bisa disebabkan oleh pembuluh darah yang menyempit akibat timbulnya plak-plak aterosklerotik atau karena adanya sumbatan yang disebabkan oleh trombus (Olson, 2004).

Plak-plak aterosklerotik akan terbentuk jika ada bentuk teroksidasi LDL yang menempel pada deposit lemak pada pembuluh darah. Oleh karena itu, zat-zat yang mempunyai sifat antioksidan (seperti flavonoid) dapat mencegah timbulnya plak-plak aterosklerotik (Roy, Lundy, dan Brantley, 2004).

Selain melalui efek antioksidan, senyawa flavonoid yang terdapat dalam kakao juga dapat mempengaruhi kesehatan kardiovaskuler melalui mekanisme lain. Konsep atherogenesis saat ini meliputi keterlibatan sistem imun dan radang inflamasi kronis melalui tahap-tahap inisiasi dan perkembangan aterosklerosis yang rumit. Pengaktifan endotelial vaskuler dengan pengaturan adhesi molekul dinyatakan memiliki peran penting dalam hal timbulnya inflamasi vaskuler dengan membiarkan adhesi leukosit dan monosit pada endotelial vaskuler selama tahap awal atherogenesis. Meningkatnya reaktivitas platelet dan pembentukan agregat karena kelainan endotelial akan mendorong timbulnya trombosis arterial dan aterosklerosis (Steinberg, Bearden, dan Keen, 2003).

Senyawa polifenol yang terdapat dalam kakao ternyata dapat menghambat aktivasi platelet secara *ex vivo*. Beberapa indeks aktivasi platelet berkurang dalam rentang waktu 2 – 6 jam setelah pemberian minuman kakao. Hal yang sama juga terjadi terhadap ekspresi P-selektin yang distimulasi ADP. Adanya ekspresi P-selektin yang distimulasi ADP merupakan penanda biologis adanya trombogenesis (Rein *et al.*, 2000a).

Penghambatan terhadap aktivasi platelet juga dapat melalui mekanisme lain yaitu perubahan metabolisme sekunder dari eikosanoid. Eikosanoid merupakan metabolit bioaktif dari asam arakhidonat yang berperan dalam proses inflamasi. Dua senyawa eikosanoid yang dijadikan acuan dalam menilai adanya inflamasi adalah leukotrien dan prostasiklin. Leukotrien akan menstimulasi agregasi platelet sebaliknya prostasiklin akan menghambat agregasi platelet. Leukotrien merupakan vasokonstriktor dan proinflamatori sedangkan prostasiklin adalah vasodilator dan antiinflamatori. Proses inflamasi terjadi bila kadar leukotrien lebih besar dari pada prostasiklin. Pemberian produk kakao ternyata dapat menyeimbangkan kadar prostasiklin dan leukotrien (Scramm *et al.*, 2001).

2.4.4 Manfaat yang berkaitan dengan respon imun dan antiinflamasi

Penelitian tentang efek polifenol yang terkandung dalam cairan kakao pada berbagai sel imun manusia dan fungsi-fungsinya secara *in vitro* telah dilakukan. Hasilnya menunjukkan bahwa sifat immunosupresif senyawa flavonoid yang terdapat dalam kakao akan menurunkan produksi hidrogen peroksida dan anion superoksida oleh granulosit yang distimulasi forbol miristat asetat dan

limfosit yang distimulasi vitamin K. Senyawa-senyawa flavonoid tersebut juga menekan proliferasi limfosit serta produksi mRNA interleukin (IL)-2 dan protein yang berperan dalam respon fitohemaglutinin. IL-2 berperan dalam pengendalian ekspansi sel T dan aktivasi serta pengaturan produk-produknya yang merupakan reaksi awal respon imun. Jika dibandingkan efek penghambatan terhadap produksi spesies oksigen reaktif dan proliferasi limfosit antara epikatekin dengan total senyawa polifenol kakao hasilnya sama (Sanbongi, Osakabe, Natsume, Takizawa, Gomi, dan Osawa, 1998).

Aktivitas antiinflamasi dan pengaturan sistem imun terjadi melalui penghambatan enzim fosfolipase A2, siklooksigenase, dan lipoksigenase dan akibatnya terjadi penurunan kadar prostaglandin E2. Telah diketahui bahwa senyawa flavonoid merupakan antioksidan kuat dan mampu menghambat kerja enzim siklooksigenase dan lipoksigenase (Romanczyk *et al.*, 1997).

2.5 Pengolahan Biji Kakao

Proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya dilakukan melalui tahapan proses sebagai berikut (Subagja, 2009):

1. Biji kakao dimasukkan ke dalam separator untuk dipisahkan dari kotoran-kotoran yang tersangkut. Pemisahan juga dilakukan terhadap batu-batuan dan logam-logam yang tersangkut sehingga kadar kotoran yang tersisa kurang dari 3 persen.
2. Biji kakao yang telah bersih, disangrai pada suhu 60 – 70 °C selama 1 jam. Pemanasan ini gunanya untuk memudahkan pemisahan kulit dan mengatur warna biji kakao. Setelah pemanasan, pada biji kakao yang sudah kering dilakukan penggilingan ringan untuk dipisahkan dari kulitnya dan dimasukkan ke dalam silo nib, sedang kulit dimasukkan ke dalam silo kulit.
3. Biji kakao yang telah dipisahkan dari kulitnya (nib) diolah menjadi pasta kakao melalui proses penyangraian dengan kondisi pemanasan pada suhu 130 – 140 °C. Hasil yang diperoleh dimasukkan ke dalam mesin penggiling, kemudian digiling kembali pada mesin giling kedua untuk menambah tingkat kehalusannya. Pasta kakao yang dihasilkan dapat langsung dijadikan bentuk

batangan atau diproses lebih lanjut untuk mendapatkan lemak kakao dan bubuk kakao.

4. Pasta kakao dipisahkan dari lemaknya dengan cara pengepresan pada suhu 60 – 70 °C sehingga diperoleh hasil samping berupa lempengan kakao (bungkil kakao) yang masih mengandung lemak. Bungkil kakao kemudian digiling kembali hingga diperoleh bubuk kakao. Sementara itu, lemak kakao yang diperoleh dimasukkan ke dalam plastik dan didinginkan.

2.6 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

2.6.1 Teori

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut di antara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas) (Harmita, 2006a). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan fase gerak berupa cairan. KCKT merupakan teknik analisis yang paling cepat berkembang dalam kimia analitik.

KCKT memiliki beberapa keuntungan antara lain (Johnson dan Stevenson, 1991; Harmita, 2006a):

- Waktu analisis cepat, seringkali hanya 15 – 30 menit.
- Daya pisahnya baik.
- Peka, tergantung pilihan detektor dan eluen yang digunakan.
- Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah.
- Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi.
- Kolom dapat dipakai kembali.
- Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil, serta ion.
- Mudah untuk memperoleh kembali cuplikan.

2.6.2 Komponen-Komponen KCKT

Alat KCKT terdiri dari beberapa bagian, yaitu pompa, injektor, kolom, detektor, dan integrator (Harmita, 2006a) :

2.6.2.1 Pompa

Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen ke dalam kolom. Jenis-jenis pompa antara lain pompa tekanan tetap, pompa semprit, dan pompa tekanan uap.

2.6.2.2 Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Jenis-jenis injektor antara lain aliran henti, septum, katup jalan kitar, dan auto injektor.

2.6.2.3 Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom merupakan bagian penting dalam KCKT, karena ikut menentukan keberhasilan analisis. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam memilih kolom antara lain :

- Panjang kolom

Semakin panjang kolom, maka waktu retensi akan bertambah, namun pemisahan semakin baik.

- Diameter kolom

Dapat dibagi dua kelompok yaitu kolom analitik dengan diameter dalam 2 – 6 mm, dan kolom preparatif dengan diameter dalam 6 mm atau lebih yang dapat dipakai untuk ukuran cuplikan yang besar.

- Pengisi kolom

Ukuran dan bentuk partikel pengisi akan mempengaruhi kepadatan kolom, dan hal ini akan mempengaruhi aliran fase gerak secara langsung, dan pemisahan atau efisiensi kolom secara tidak langsung.

- Fase gerak

Harus selektif terhadap komponen yang dikehendaki dan tidak kental agar dapat memperkecil penurunan tekanan.

- Tekanan kolom

Tekanan kolom timbul akibat hambatan terhadap eluen. Partikel yang berdiameter lebih kecil, dan menggunakan eluen dengan viskositas rendah dapat menurunkan tekanan kolom.

2.6.2.4 Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya. Macam-macam detektor yang dapat digunakan antara lain detektor serapan optik, detektor indeks bias, detektor fluoresensi, detektor elektrokimia, detektor ionisasi nyala, detektor *evaporation light scattering*, serta detektor radioaktif.

2.6.2.5 Integrator

Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak. Ada dua macam integrator, yaitu integrator piringan yang bekerja secara mekanik, serta integrator digital/elektronik yang dapat memberikan ketelitian tinggi dan waktu integrasi yang singkat.

2.6.3 Fase Gerak

Fase gerak pada KCKT merupakan variabel yang mempengaruhi pemisahan. Variasi fase gerak pada KCKT sangat beragam dalam hal kepolaran dan selektivitasnya terhadap komponen dalam sampel. Secara umum fase gerak yang baik harus mempunyai sifat sebagai berikut (Johnson dan Stevenson, 1991; Harmita, 2006a):

- Murni.
- Tidak bereaksi dengan kolom.
- Sesuai dengan detektor.
- Dapat melarutkan cuplikan.
- Selektif terhadap komponen.
- Viskositasnya rendah.
- Memungkinkan dengan mudah untuk memperoleh cuplikan kembali jika diperlukan.
- Harganya wajar.
- Dapat memisahkan zat dengan baik.

2.6.4 Analisis Kuantitatif dengan KCKT

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah mengukur luas puncak kromatogramnya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu (Johnson dan Stevenson, 1991; Harmita, 2006a):

2.6.4.1 Metode Baku Luar

Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kurva kalibrasi dibuat dengan cara memplotkan antara luas puncak kromatogram yang dianalisis terhadap konsentrasi larutan baku pembanding. Larutan sampel yang akan dianalisis disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kadar sampel diperoleh dengan cara memasukkan luas puncak sampel pada kurva kalibrasi atau dengan perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan.

2.6.4.2 Metode Baku Dalam

Sejumlah baku dalam ditambahkan ke dalam sampel dan baku pembanding. Kemudian larutan campuran komponen baku pembanding dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan perbandingan luas puncak terhadap komponen baku pembanding. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan cara ini adalah kesalahan pada volume injeksi dapat dieliminasi. Kesulitan cara ini adalah menemukan baku dalam yang tepat.

2.6.5 Perhitungan dalam KCKT

Beberapa parameter yang lazim digunakan untuk menilai efektivitas dan efisiensi pada KCKT adalah retensi relatif (α), jumlah lempeng teoritis (N), nilai HETP, faktor kapasitas (k'), dan resolusi (R) (Harmita, 2006a):

- Retensi relatif (α)

$$\alpha = \frac{t_2 - t_a}{t_1 - t_a}$$

t_1 = waktu retensi baku pembanding

t_2 = waktu retensi zat uji

t_a = waktu retensi komponen inert (fase gerak)

- Jumlah lempeng teoritis (N)

$$N = 16 \times \frac{t^2}{W^2}$$

t = waktu retensi zat

W = lebar alas puncak

- Nilai HETP

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

L = panjang kolom

N = jumlah lempeng teoritis

- Faktor kapasitas (k')

$$k' = \frac{t}{t_a} - 1$$

t = waktu retensi zat

t_a = waktu retensi fase gerak

- Resolusi (R)

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{(\alpha - 1)}{(\alpha)} \frac{(k')}{(k' - 1)}$$

N = jumlah lempeng teoritis

k' = faktor kapasitas

α = retensi relatif

2.7 Validasi Metode Analisis

Validasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Tujuan utama validasi adalah untuk menjamin metode analisis yang digunakan mampu memberikan hasil yang cermat dan handal serta dapat dipercaya (Harmita, 2006b).

Beberapa parameter yang harus diuji dalam validasi metode analisis antara lain: selektivitas (spesifitas), kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), linieritas dan rentang, batas deteksi (*Limit of Detection* = LOD) dan batas kuantitasi (*Limit of Quantitation* = LOQ), ketangguhan metode (*ruggedness*), dan kekuatan (*robustness*) (Harmita, 2006b).

2.7.1 Kecermatan (akurasi)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan.

2.7.2 Keseksamaan (presisi)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

2.7.3 Selektivitas (spesifitas)

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel.

2.7.4 Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

2.7.5 Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko dan formula di bawah ini dapat digunakan untuk perhitungan.

$$Q = \underline{k \times S_b}$$

SI

Q = LOD (batas deteksi) atau LOQ (batas kuantitasi)

k = 3 untuk batas deteksi atau 10 untuk batas kuantitasi

S_b = simpangan baku respon analitik dari blangko

Sl = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = *slope* (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ($S_{y/x}$).

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S(y/x)}{b} \quad \text{dan} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \times S(y/x)}{b}$$

2.7.6 Ketangguhan metode (*ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dll. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara lab dan antar analisis.

2.7.7 Kekuatan (*robustness*)

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi.

2.8 Metode Analisis Katekin dan Epikatekin

Berikut ini adalah beberapa metode analisis katekin dan epikatekin yang telah dilakukan oleh para peneliti terdahulu, yaitu:

2.8.1 Kandungan Fenol dan Teobromin dari Cokelat Gelap, Susu, dan Putih di Pasaran Malaysia (Meng, Jalil, dan Ismail, 2008)

Kondisi Analisis : KCKT

Kolom : C18; 4,6 mm ID x 150 mm (5 μ m)

Laju alir : 0,8 ml/menit

Fase gerak A : 1 % asam trifluoroasetat dalam asetonitril
 Fase gerak B : 1 % asam trifluoroasetat dalam air
 Gradien : 0–10% A (5 menit); 10–25%A (25 menit); 100%
 A (5 menit)
 Detektor : UV-8010, panjang gelombang 280 nm
 Volume injeksi : 10 μ l

2.8.2 Penentuan Sensitivitas Tinggi Katekin secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan Deteksi Elektrokimia (Miyashita, Kotani, dan Kusu, 2001)

Kondisi Analisis I: KCKT

Kolom : CAPCELL PAK C18 mikrobor ODS (Shiseido); 1
 mm x 150 mm
 Suhu Kolom : 40°C
 Laju alir : 25 μ l/menit
 Fase gerak : asam fosfat/air/metanol (0,5/81/19, v/v/v)
 Detektor : elektrokimia LC-4C (BAS), potensial +600 mV
 vs. SCE
 Volume injeksi : 5,0 μ l

Kondisi Analisis II: KCKT

Kolom : LiChrospher 100 RP-18 ODS (Cica-Merck); 4 mm
 x 250 mm
 Suhu Kolom : 25°C
 Laju alir : 0,45 ml/menit
 Fase gerak : asetonitril : 0,1 mol/l dapar fosfat, pH 2,5 (15:85,
 v/v)
 Gradien : 0 menit, 10 % B; 10 menit, 60 % B; 15 menit, 60
 % B
 Detektor : elektrokimia EDP-1 (Kotaki), potensial +600 mV
 vs. SCE
 Volume injeksi : 5,0 μ l

2.8.3 Epikatekin dalam Plasma Manusia : Penetapan Kadar In Vivo dan Efek Konsumsi Cokelat pada Status Oksidasi Plasma (Rein, Lotito, Holt, Keen, Schmitz, dan Fraga, 2000b)

KCKT	: HP 1100
Kolom	: Alltima C18; 4,6 mm x 150 mm (5 µm) dengan kolom penjaga C18 5 µm (Alltech Associates)
Laju alir	: 1 ml/menit
Fase gerak A	: 40 % metanol dan 60 % 50 mmol/l Na-asetat, pH 5,8
Fase gerak B	: 7% metanol, 93% metanol/100 mmol/l Na-asetat, pH 5,2
Volume injeksi	: 5 µl

Kondisi I

Isokratik	: 60 % A dan 40 % B
Detektor	: Coulochem II detektor coulometrik dengan sel analitik 5011 digunakan sebagai elektroda tunggal, dengan sel penjaga diatur pada 1800 mV, sel 1 diatur untuk membersihkan pada 1100 mV, dan sel 2 diatur untuk analisis pada 1400 mV

Kondisi II

Gradien	: 80 – 60 % B (0 – 1 menit); 60 - 20 % B (1 – 3,5 menit); 20 % B isokratik (3,5 – 20 menit); 20 – 80 % B (20 – 30 menit)
Detektor	: Coulochem II detektor coulometrik dengan sel analitik 5011 digunakan sebagai elektroda tunggal, dengan sel penjaga diatur pada 1800 mV, sel 1 diatur untuk membersihkan pada 1100 mV, dan sel 2 diatur untuk analisis pada 1400 mV

Kondisi III

Gradien	: 80 – 60 % B (0 – 1 menit); 60 % B (1 – 3 menit); 6 – 20 % B (3 – 7 menit); 20 – 0 % B (7 – 9 menit); 0 % B (9 – 15 menit); 0 – 20 % B (15 – 18 menit); 20
---------	---

– 40 % B (18 – 20 menit); 40 – 60 % B (20 – 23 menit); 60 – 25 % B (23 – 25 menit)

Detektor : ESA CoulArray 5600 detektor multielektroda *array*, potensial yang digunakan 250, 1150, 1185, 1200, 1250, 1300, 1700, dan 1800 mV.

2.8.4 Analisis Polifenol dalam Cairan Kakao, Kakao, dan Cokelat dengan KCKT Fase Normal dan Fase Terbalik (Natsume, et al., 2000).

KCKT : Tosoh
Kolom : Deverosil ODS HG-5 (nomura Chemical Co. Ltd.); 4,6 mm ID x 250 mm (5 μ m)
Laju alir : 0,8 ml/menit
Fase gerak A : 0,1 % asam trifluoroasetat dalam asetonitril
Fase gerak B : 0,1 % asam trifluoroasetat dalam air
Gradien : 0–10% A (5 menit); 10–25%A (25 menit); 100% A (5 menit)
Detektor : UV-8010, panjang gelombang 280 nm
Volume injeksi : 10,0 μ l

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Kuantitatif, Gedung Departemen Farmasi, FMIPA UI, Depok. Penelitian berlangsung mulai bulan Maret hingga Juni 2010.

3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi: KCKT Shimadzu model LC-6A, detektor UV-Vis SPD-10A, kolom Kromasil C-18 100-5; 250 x 4,5 mm, pemroses data Shimadzu CR-4A Chromatopac, *microsyringe* dengan ujung tumpul (Hamilton), spektrofotometer UV-Vis Jasco V-630, pH meter, lemari pengering/oven (Memmert), timbangan analitik, alat pengocok vorteks, mikropipet (Eppendorf 100 μ l), neraca analitik (Ohaus), *ultrasonic bath* (Branson), alat sentrifugasi (Kubota), serta alat-alat gelas yang umum dipakai dalam laboratorium kimia analisis.

3.3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi: Bahan standar (+)-katekin (Sigma-Aldrich, C1251) dan (-)-epikatekin (Sigma-Aldrich, E1753). Sampel hasil olahan biji kakao diperoleh dari Balai Besar Industri Agro, Bogor. Bahan kimia untuk fase gerak seperti asetonitril (Merck), asam trifluoroasetat (Merck), metanol (Merck) dengan kualifikasi *HPLC grade*. Bahan kimia untuk preparasi sampel seperti heksana (Merk), metanol (Merk), dan air dengan kualifikasi pro analisis. Larutan metanol 30 %: dibuat dengan cara melarutkan 300 ml larutan metanol *HPLC grade* dalam air, kemudian ditepatkan hingga 1 liter. Larutan asam trifluoroasetat 4 %: dibuat dengan cara melarutkan 1,0 ml asam trifluoroasetat dalam labu ukur 25 ml.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan larutan induk katekin dan epikatekin

Standar katekin anhidrat ditimbang secara seksama lebih kurang 10 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Selanjutnya ditambahkan larutan metanol 30 % dalam air sekitar 80 ml dan dilakukan sonikasi selama 5 menit hingga larut. Kemudian volume dilarutkan hingga tanda batas. Konsentrasi larutan katekin yang diperoleh lebih kurang 100 ppm. Untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu, maka dilakukan pengenceran terhadap larutan induk.

Standar epikatekin ditimbang secara seksama lebih kurang 50 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml. Selanjutnya ditambahkan larutan metanol 30 % dalam air sekitar 40 ml dan dilakukan sonikasi selama 5 menit hingga larut. Kemudian volume dilarutkan hingga tanda batas. Konsentrasi larutan katekin yang diperoleh lebih kurang 1000 ppm. Untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu, maka dilakukan pengenceran terhadap larutan induk.

3.4.2 Pemilihan kondisi analisis penetapan kadar katekin dan epikatekin

Untuk keperluan pemilihan kondisi analisis, dilakukan pembuatan larutan campuran katekin dan epikatekin masing-masing dengan konsentrasi 40 ppm. Dipipet sebanyak 4 ml masing-masing dari larutan induk katekin dan larutan induk epikatekin yang telah diencerkan 10 kali (konsentrasi 100 ppm). Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan ditepatkan hingga tanda batas dengan larutan metanol 30 % dalam air. Selanjutnya dikocok hingga homogen. Sebanyak 20 μ l larutan diinjeksikan pada alat KCKT.

Selanjutnya, dilakukan upaya optimasi terhadap metode analisis yang akan digunakan. Dalam penelitian ini, dilakukan tiga tahap optimasi, yaitu : [1] melakukan penetapan panjang gelombang analisis, [2] melakukan optimasi terhadap komposisi fase gerak, dan [3] melakukan optimasi terhadap laju alir fase gerak.

Pada tahap penentuan panjang gelombang analisis, dibuat larutan dengan konsentrasi 40 ppm dan 100 ppm dari larutan induk katekin dan epikatekin.

Panjang gelombang maksimumnya ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis dalam pelarut metanol 30 %.

Kemudian dilakukan optimasi terhadap komposisi fase gerak, kromatografi dilakukan dengan pilihan fase gerak terdiri atas air/asetonitril/asam trifluoroasetat 4 % (komposisi awal 90/10/1, v/v/v). Laju alir fase gerak diatur pada kecepatan 1,0 ml/menit. Perubahan komposisi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak

Komposisi Fase Gerak (v/v/v)	Kondisi Analisis		
	1	2	3
Air	95	90	85
Asetonitril	5	10	15
Asam trifluoroasetat 4 %	1	1	1

Masing-masing kondisi di atas dicatat waktu retensinya dan dihitung areanya. Kondisi yang dipilih adalah jumlah lempeng teoritis (N) yang besar, HETP yang kecil, area yang besar, dan waktu retensi yang tidak terlalu cepat maupun lambat.

Terhadap hasil terbaik yang diperoleh pada kedua tahap optimasi di atas, selanjutnya dilakukan optimasi terhadap laju alir fase gerak. Laju alir fase gerak diatur pada kecepatan 0,8; 1,0; dan 1,2 ml per menit.

Masing-masing kondisi di atas dicatat waktu retensinya dan dihitung areanya. Kondisi yang dipilih adalah jumlah lempeng teoritis (N) yang besar, HETP yang kecil, area yang besar, dan waktu retensi yang tidak terlalu cepat maupun lambat.

3.4.3 Validasi metode analisis katekin dan epikatekin

3.4.3.1 Uji spesifitas atau selektivitas

Sebanyak 20 µl larutan 30 % metanol dalam air diinjeksikan ke alat KCKT dengan kondisi terpilih. Hal ini dilakukan sebelum validasi metode maupun sebelum analisis sampel.

3.4.3.2 Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas katekin dan epikatekin

Kurva kalibrasi katekin dibuat dengan cara membuat satu seri larutan katekin dengan konsentrasi sekitar 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20, dan 40 µg/ml. Untuk epikatekin, kurva kalibrasi dibuat dengan cara membuat satu seri larutan epikatekin dengan konsentrasi sekitar 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, dan 160 µg/ml (Subagja, 2009).

Sebanyak 20 µl dari masing-masing larutan tersebut diinjeksikan ke alat KCKT dengan kondisi terpilih. Area yang diperoleh dari masing-masing larutan tersebut dicatat.

Dari data pengukuran kemudian dibuat kurva kalibrasi dengan memplotkan kadar zat sebagai sumbu X dan area (*counts*) sebagai sumbu Y sehingga diperoleh persamaan regresi linear. Dari data pengukuran tersebut juga dihitung koefisien korelasi (*r*) yang menunjukkan linearitas dari katekin dan epikatekin.

3.4.3.3 Pengukuran batas deteksi dan batas kuantitasi katekin dan epikatekin

Batas deteksi dan batas kuantitasi dari katekin dan epikatekin dihitung menggunakan Microsoft Excel dari data yang diperoleh untuk pembuatan kurva kalibrasi kedua zat tersebut.

3.4.3.5 Uji presisi dan uji perolehan kembali katekin dan epikatekin

Uji perolehan kembali katekin dan epikatekin dalam penelitian ini menggunakan metode *spike*, yaitu dengan cara menambahkan larutan standar katekin dan epikatekin dengan konsentrasi masing-masing 50 %, 100 %, dan 150 % terhadap kandungan katekin maupun epikatekin yang terdapat dalam sampel (Wollgast, 2004). Sebanyak 20 µl dari masing-masing larutan tersebut diinjeksikan ke alat KCKT dengan kondisi terpilih. Untuk setiap konsentrasi larutan diulang sebanyak tiga kali.

Nilai persentase uji perolehan kembali (% UPK) katekin dan epikatekin dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ UPK} = \frac{C_s - C_{ns}}{C_{st}} \times 100$$

C_s = kadar total zat dalam sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_{ns} = kadar zat sebenarnya dalam sampel

C_{st} = kadar standar yang ditambahkan

Uji presisi katekin dan epikatekin menggunakan data yang sama untuk penghitungan persen perolehan kembali, namun yang diambil adalah data kadar zat dalam sampel tanpa *spike*.

3.4.4 Ekstraksi dan analisis katekin dan epikatekin dalam sampel

Penetapan kadar katekin dan epikatekin dalam sampel dilakukan dalam dua tahap yaitu proses ekstraksi dan analisis kuantitatif katekin dan epikatekin.

3.4.4.1 Proses ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Wollgast (2004) yang telah dimodifikasi sebagai berikut: ke dalam 200 mg sampel ditambahkan 5 ml n-heksana kemudian dilakukan sonikasi selama 5 menit dalam *ultrasonic bath*. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Larutan n-heksana dibuang dengan dekantasi. Proses ini diulang 2 kali. Endapan hasil sentrifugasi tersebut kemudian dikeringkan dengan cara mengalirkan gas nitrogen.

Setelah dikeringkan, endapan tersebut ditambahkan larutan metanol sebanyak 4 ml dan air sebanyak 1 ml lalu diaduk dengan vorteks selama 5 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 30 menit. Selanjutnya hasil sentrifugasi tersebut diambil bagian cairannya dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml. Kemudian ditambahkan metanol 30 % sampai tanda batas.

3.4.4.2 Analisis kuantitatif katekin dan epikatekin

Hasil ekstraksi di atas disaring dengan membran Millipore 0,45 μm . Hasil saringan dimasukkan ke dalam botol cokelat ukuran 10 ml. Jumlah yang diinjeksikan pada alat KCKT sebanyak 20 μl .

Area katekin dan epikatekin dicatat. Kadar katekin dan epikatekin dihitung dengan persamaan regresi linear yang diperoleh dari kurva kalibrasi masing-masing zat tersebut dengan bantuan Microsoft Excel.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan larutan induk katekin dan epikatekin

Tingkat kemurnian katekin diketahui sebesar 99 % sehingga dengan dilakukan penimbangan sebanyak 10,5 mg akan diperoleh katekin setara dengan 10,395 mg. Setelah dilarutkan dalam larutan metanol 30 % dalam air dan ditepatkan hingga 100 ml akan diperoleh larutan induk katekin 103,95 ppm.

Tingkat kemurnian epikatekin diketahui sebesar 96 % sehingga dengan dilakukan penimbangan sebanyak 52,3 mg akan diperoleh epikatekin setara dengan 50,208 mg. Setelah dilarutkan dalam larutan metanol 30 % dalam air dan ditepatkan hingga 100 ml akan diperoleh larutan induk katekin 1004,16 ppm.

Pembuatan larutan induk katekin dan epikatekin ini ditujukan untuk optimasi serta pembuatan kurva kalibrasi. Rentang konsentrasi yang digunakan untuk katekin antara 2 hingga 40 ppm. Sedangkan untuk epikatekin digunakan rentang antara 20 hingga 160 ppm. Oleh sebab itu, larutan induk katekin dibuat dengan konsentrasi 100 ppm dan larutan induk epikatekin dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm. Hal ini karena menurut penelitian sebelumnya, kadar epikatekin dalam sampel kakao lebih besar dari katekin (Subagja, 2009).

4.2 Pemilihan kondisi analisis penetapan kadar katekin dan epikatekin

Dalam melakukan pemilihan kondisi analisis penetapan kadar katekin dan epikatekin, metode analisis yang digunakan sebagai acuan awal adalah menggunakan fase diam kolom C18; 4,6 mm ID x 150 mm (5 μ m), fase gerak A adalah 1 % asam trifluoroasetat dalam asetonitril, fase gerak B adalah 1 % asam trifluoroasetat dalam air, elusi dilakukan secara gradien dengan laju alir 0,8 ml/menit, serta dideteksi dengan detektor UV-8010 pada panjang gelombang 280 nm (Meng, Jalil, dan Ismail, 2008).

Biji kakao tidak hanya mengandung katekin dan epikatekin. Di dalam biji kakao juga terdapat senyawa lain yang mungkin memiliki waktu retensi yang hampir berdekatan dengan katekin dan epikatekin. Oleh sebab itu, dalam

percobaan berikutnya analisis dilakukan selama 40 menit dengan beberapa penyesuaian sebagaimana disebutkan pada Bab 3.

Sebelum melakukan pemilihan kondisi analisis yang nantinya digunakan dalam analisis katekin dan epikatekin dalam sampel, maka langkah pertama yang perlu dilakukan adalah memastikan bahwa katekin dan epikatekin memiliki waktu retensi yang berbeda. Metode analisis yang diacu menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi fase balik yang dilakukan secara gradien (Meng, Jalil, dan Ismail, 2008). Pada penelitian ini dilakukan modifikasi dengan mencari komposisi fase gerak yang pemisahannya paling baik pada gradien yang digunakan. Komposisi fase gerak tersebut dipakai untuk analisis secara isokratik.

Suatu zat dapat dianalisis menggunakan KCKT yang dihubungkan dengan detektor ultraviolet jika zat tersebut memiliki gugus kromofor. Gugus kromofor yang berupa ikatan rangkap terkonjugasi ataupun suatu gugus fungsional menyebabkan terjadinya serapan di daerah UV dan tampak (Harmita, 2006a). Katekin dan epikatekin memiliki gugus kromofor berupa cincin aromatis dan gugus fungsional $-OH$. Oleh karena itu, senyawa ini dapat dianalisis dengan detektor ultraviolet.

Katekin dan epikatekin merupakan isomer. Secara teoritis keduanya memiliki polaritas yang sama. Dengan demikian, keduanya akan memiliki waktu retensi yang sama. Namun hasil penelurusan terhadap beberapa pustaka menunjukkan hal yang sebaliknya. Katekin dan epikatekin memiliki waktu retensi yang berbeda. Untuk sistem KCKT fase balik, waktu retensi katekin lebih kecil dibandingkan dengan waktu retensi epikatekin (LECO Corporation, 2006; Wollgast, 2004). Dalam penelitian ini diperoleh hasil yang sama, waktu retensi katekin relatif lebih kecil dibanding waktu retensi epikatekin. Waktu retensi katekin adalah 16,552 menit, sedangkan epikatekin 32,469 menit. Ini membuktikan bahwa polaritas kedua zat tersebut tidak sama. Gambar kromatogram yang menunjukkan waktu retensi katekin dan epikatekin dapat dilihat pada gambar 4.1 dan 4.2.

Setelah diketahui bahwa katekin dan epikatekin dapat dianalisis dengan metode yang ada, tahap selanjutnya adalah melakukan optimasi terhadap kondisi analisis tersebut. Dalam penelitian ini dilakukan tiga tahap optimasi, yaitu : [1]

melakukan penetapan panjang gelombang analisis, [2] melakukan optimasi terhadap komposisi fase gerak, dan [3] melakukan optimasi terhadap laju alir fase gerak.

4.2.1 Penetapan panjang gelombang analisis

Panjang gelombang maksimum katekin dalam pelarut metanol 30 % adalah 278 nm. Panjang gelombang maksimum epikatekin dalam pelarut metanol adalah 278,5 nm. Berdasarkan acuan metode analisis, panjang gelombang optimum yang digunakan adalah 280 nm. Oleh karena itu, dilakukan percobaan pada detektor ultraviolet. Panjang gelombang optimum untuk analisis katekin dan epikatekin dipilih pada 280 nm. Data percobaan dapat dilihat pada gambar 4.3 – 4.7 dan tabel 4.1.

Penentuan panjang gelombang optimum katekin dan epikatekin dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Untuk mencari panjang gelombang optimum tersebut, dibuat spektrum serapan masing-masing zat, baik katekin maupun epikatekin pada konsentrasi 40 ppm dan 100 ppm. Penentuan panjang gelombang optimum tidak dilakukan dengan melihat perpotongan spektrum serapan katekin dan epikatekin karena kedua senyawa ini memiliki pola spektrum serapan yang hampir sama. Oleh karena dimungkinkan sedikit perubahan panjang gelombang akibat perbedaan alat antara spektrofotometer dengan detektor UV, maka dilakukan pengecekan juga pada detektor UV. Hasilnya menunjukkan bahwa tidak terjadi perbedaan serapan yang signifikan. Dalam hal ini, panjang gelombang yang dipilih adalah 280 nm karena memberikan area yang lebih besar.

4.2.2 Optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak

Kondisi analisis katekin dan epikatekin dipilih menggunakan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v). Pada kondisi analisis ini katekin memiliki waktu retensi 16,552 menit dan epikatekin 32,469 menit. Kromatogram katekin dan epikatekin dengan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 280 nm dan laju alir 1,0 ml/menit dalam berbagai fase gerak dapat dilihat pada gambar 4.8 – 4.10. Data waktu retensi, area, jumlah plat teoritis, dan

ukuran efisiensi kolom pada berbagai komposisi fase gerak dapat dilihat pada tabel 4.1.

Setelah mendapatkan panjang gelombang maksimum yang mewakili kedua zat, penelitian dilanjutkan dengan mencari kondisi analisis optimum yang meliputi fase gerak dan laju alir. Optimasi kondisi analisis dilakukan menggunakan larutan campuran standar katekin dan epikatekin masing-masing dengan konsentrasi sekitar 40 ppm. Kedua senyawa ini lalu dianalisis menggunakan KCKT dengan komposisi fase gerak yang berbeda-beda. Komposisi tersebut diambil menyesuaikan gradien yang digunakan pada metode analisis yang diacu (Meng, Jalil, dan Ismail, 2008).

Dari hasil percobaan, diperoleh fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v) sebagai kondisi terpilih. Pada kondisi ini, diperoleh nilai HETP dan N yang cukup baik, area yang cukup besar, serta waktu retensi yang tidak terlalu cepat maupun lambat. Sementara itu, fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (95:5:1, v/v/v) menunjukkan waktu retensi yang terlalu lambat. Sebaliknya, fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (85:15:1, v/v/v) menunjukkan waktu retensi yang lebih cepat serta jarak waktu retensi katekin dan epikatekin yang terlalu singkat.

4.2.3 Optimasi terhadap laju alir fase gerak

Setelah mendapatkan fase gerak yang optimum, dilakukan optimasi terhadap perubahan laju alir fase gerak. Laju alir diatur pada laju 0,8; 1,0; dan 1,2 ml per menit. Dari ketiga laju alir tersebut, ternyata yang memberikan hasil terbaik adalah fase gerak dengan laju alir 1,0 ml per menit karena memberikan nilai N dan HETP yang cukup baik, area yang cukup besar, serta waktu retensi yang tidak terlalu cepat maupun lambat. Pada kondisi analisis ini katekin memiliki waktu retensi 16,552 menit dan epikatekin 32,469 menit. Selanjutnya laju alir 1,0 ml per menit inilah yang digunakan dalam validasi metode analisis dan penetapan kadar katekin dan epikatekin dalam sampel kakao.

Kromatogram katekin dan epikatekin dengan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 280 nm dan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v) dalam berbagai laju alir dapat dilihat pada gambar 4.11 – 4.13.

Data waktu retensi, area, jumlah plat teoritis, dan ukuran efisiensi kolom pada berbagai laju alir dapat dilihat pada tabel 4.1.

Berdasarkan tahap-tahap optimasi di atas, didapatkan hasil kondisi optimum analisis katekin dan epikatekin sebagai berikut:

- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Waktu operasi : 40 menit
- Kolom : Kromasil C-18 10-5
- Fase gerak : air/asetonitril/asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v)
- Volume injeksi : 20 μ l
- Detektor : UV-Vis SPD-10A panjang gelombang 280 nm

4.3 Uji spesifitas dan selektivitas

Uji ini dimaksudkan untuk melihat bahwa waktu retensi dari zat yang akan dianalisis tidak terganggu dengan adanya zat lain. Uji ini dilakukan dengan cara menginjeksikan larutan metanol 30 % sebanyak 20 μ l sebelum melakukan pembuatan kurva kalibrasi dan analisis sampel.

Hasil percobaan menunjukkan tidak adanya gangguan di daerah waktu retensi katekin dan epikatekin. Berdasarkan hasil tersebut, metode analisis katekin ini cukup spesifik. Gambar kromatogram dapat dilihat pada gambar 4.14.

4.4 Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas katekin dan epikatekin

Setelah diperoleh metode terpilih untuk analisis katekin dan epikatekin, maka dilakukan validasi metode. Tahap paling awal dari validasi metode ialah membuat kurva kalibrasi dan linearitas. Pada pembuatan kurva kalibrasi dan linearitas dibuat larutan campuran katekin dan epikatekin dengan konsentrasi berturut-turut 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 dan 12 ppm untuk katekin serta 60 ; 80 ; 100 ; 120 ; 140 dan 160 ppm untuk epikatekin. Oleh karena penyesuaian dengan konsentrasi katekin dan epikatekin dalam sampel kakao, maka ditambahkan dua titik konsentrasi lagi, yaitu campuran katekin dan epikatekin 20 dan 40 ppm. Masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT dengan volume penyuntikan 20 μ l pada kondisi analisis optimum.

Dari data yang diperoleh didapatkan persamaan regresi linear untuk katekin yaitu $y = 21511x + 74781$ dengan koefisien korelasi (r) = 0,99995.

Sedangkan persamaan regresi linear epikatekin adalah $y = 16084x + 73083$ dengan $r = 0,99972$. Hasil tersebut memenuhi syarat linearitas karena memiliki nilai r lebih dari 0,999.

Data kurva kalibrasi katekin dapat dilihat pada tabel 4.2. Data kurva kalibrasi epikatekin dapat dilihat pada tabel 4.3. Kurva kalibrasi katekin dan epikatekin dapat dilihat pada gambar 4.15 dan 4.16. Contoh kromatogram pada pembuatan kurva kalibrasi dapat dilihat pada gambar 4.17.

4.5 Pengukuran batas deteksi dan batas kuantitasi katekin dan epikatekin

Berdasarkan persamaan regresi linear masing-masing zat, dapat dihitung secara statistik batas deteksi dan batas kuantitasi katekin dan epikatekin. Batas deteksi atau konsentrasi terkecil katekin yang masih dapat dideteksi berdasarkan perhitungan adalah 0,3975 ppm, sedangkan batas kuantitasi katekin atau konsentrasi terkecil kuantitasi katekin yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama adalah 1,3250 ppm. Konsentrasi terkecil epikatekin yang masih dapat dideteksi berdasarkan perhitungan adalah 3,7354 ppm, sedangkan konsentrasi terkecil kuantitasi epikatekin yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama adalah 12,4513 ppm. Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.5.

Pada penelitian sebelumnya yang menggunakan KCKT yang dilengkapi dengan detektor spektrometer massa, batas deteksi dan batas kuantitasi katekin yang diperoleh dari pembuatan kurva kalibrasi pada rentang konsentrasi 2 hingga 12 ppm masing-masing 0,2786 dan 0,9286 ppm. Sedangkan batas deteksi dan batas kuantitasi epikatekin yang diperoleh dari pembuatan kurva kalibrasi pada rentang konsentrasi 60 hingga 160 ppm masing-masing 7,1524 dan 23,8412 ppm (Subagja, 2009).

Batas deteksi dan batas kuantitasi katekin pada penelitian ini diperoleh pada konsentrasi yang tidak terlalu berbeda (sedikit lebih tinggi) jika dibandingkan dengan hasil dari penelitian sebelumnya. Sedangkan batas deteksi dan batas kuantitasi epikatekin pada penelitian ini diperoleh pada konsentrasi yang lebih rendah jika dibandingkan dengan hasil dari penelitian sebelumnya. Hal

ini menunjukkan bahwa analisis katekin dan epikatekin pada penelitian ini cukup baik karena dapat mendeteksi zat pada konsentrasi yang cukup rendah.

4.6 Uji presisi dan uji perolehan kembali katekin dan epikatekin

Setelah diperoleh persamaan regresi untuk katekin dan epikatekin, dilakukan uji presisi dan uji perolehan kembali. Uji presisi dilakukan untuk menentukan sifat keterulangan hasil analisis larutan pada konsentrasi yang sama berdasarkan koefisien variasinya. Uji presisi dilakukan dengan mengelompokkan ekstrak kakao ke dalam level yang disesuaikan dengan uji perolehan kembali, yaitu level 50 %, 100 %, dan 150 %. Masing-masing larutan ini disuntikkan ke alat KCKT dengan volume penyuntikkan 20 μ l pada kondisi analisis optimum. Prosedur ini dilakukan sebanyak tiga kali. Masing-masing hasil penyuntikkan dihitung koefisien variasinya.

Katekin pada level 50 % memiliki koefisien variasi 0,7225 %, level 100 % memiliki koefisien variasi 0,3687 %, dan level 150 % memiliki koefisien variasi 0,2359 %. Data hasil uji presisi katekin selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.6. Epikatekin pada level 50 % memiliki koefisien variasi 1,5480 %, level 100 % memiliki koefisien variasi 1,3685 %, dan level 150 % memiliki koefisien variasi 0,3967 %. Data hasil uji presisi epikatekin selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.7. Dengan demikian, kondisi analisis terpilih memenuhi syarat uji presisi yaitu nilai koefisien variasi kurang dari 2 %.

Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode *spike*, yaitu dengan cara menambahkan larutan standar katekin dan epikatekin dengan konsentrasi masing-masing 50 %, 100 %, dan 150 % terhadap kandungan katekin maupun epikatekin yang terdapat dalam sampel (Wollgast, 2004). Standar katekin yang ditambahkan pada level 50 %, 100 %, dan 150 % berturut-turut sebesar 0,396 mg; 0,792 mg; 1,188 mg untuk katekin serta 0,768 mg; 1,536 mg; 2,304 mg untuk epikatekin.

Masing-masing level di atas ditambahkan ke sampel kakao untuk selanjutnya dilakukan ekstraksi bersama sampel. Prosedur ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali untuk meminimalkan kesalahan yang terjadi. Larutan hasil ekstraksi kemudian disuntikkan sebanyak 20 μ l ke alat KCKT pada kondisi analisis optimum.

Hasil perolehan kembali katekin pada level 50 % adalah $115,6531 \pm 1,8483$ %, pada level 100 % adalah $83,5753 \pm 1,0281$ %, dan pada level 150 % adalah $70,1304 \pm 0,8356$ %. Data hasil perolehan kembali katekin dapat dilihat pada tabel 4.8. Hasil perolehan kembali epikatekin pada level 50 % adalah $99,9341 \pm 1,6189$ %, pada level 100 % adalah $100,1458 \pm 1,5077$ %, dan pada level 150 % adalah $99,7925 \pm 1,2301$ %. Data hasil perolehan kembali epikatekin dapat dilihat pada tabel 4.9.

Hasil uji perolehan kembali katekin menunjukkan penyimpangan yaitu muncul dua puncak yang berdekatan pada setiap level. Selain itu, seluruh nilai perolehan kembali juga jauh menyimpang dari nilai sebenarnya sekalipun untuk perhitungan UPK, total area dari kedua puncak tadi ditambahkan. Meskipun demikian, koefisien variasi katekin pada setiap level masih memenuhi syarat yaitu di bawah 2 %.

Timbulnya penyimpangan tersebut di atas diduga terjadi karena epimerisasi (-)-epikatekin menjadi (-)-katekin. Reaksi epimerisasi tersebut dapat terjadi karena pengaruh perlakuan panas dan alkalisasi selama pengolahan biji kakao, adanya paparan oksigen dari udara serta radiasi sinar UV. Senyawa (-)-katekin ini hanya bisa dipisahkan dengan penggunaan kolom kiral. Jika digunakan kolom akiral, maka waktu retensi (-)-katekin dan (+)-katekin terletak pada rentang waktu yang sama (Kofink, Papagiannopoulos, dan Galensa, 2007).

Selain epimerisasi, penyimpangan tersebut juga dapat disebabkan oleh adanya zat lain yang puncaknya berdekatan dengan katekin. Jika ini yang terjadi, maka sebaiknya dilakukan elusi dengan menggunakan fase gerak secara gradien untuk memisahkan katekin dengan zat lain yang puncaknya berdekatan dengan katekin tersebut.

Sementara untuk epikatekin, nilai UPK yang diperoleh mendekati 100 % dengan koefisien variasi di bawah 2 %. Dengan demikian, kondisi analisis terpilih memenuhi syarat uji perolehan kembali.

4.7 Ekstraksi dan analisis kuantitatif katekin dan epikatekin dalam sampel

4.7.1 Proses ekstraksi

Bobot sampel hasil olahan biji kakao yang ditimbang disesuaikan dengan jenis asal sampel serta perkiraan terhadap respon detektor. Masing-masing sampel (nib, pasta, dan bubuk kakao) ditimbang sekitar 200 mg. Gambar sampel dapat dilihat pada gambar 4.18 dan 4.19.

Proses ekstraksi mengacu pada metode yang dikembangkan Wollgast (2004) yang telah dimodifikasi sebagaimana yang dijelaskan pada Bab 3. Kandungan lemak dari sampel hasil olahan biji kakao larut bersama n-heksana. Oleh karena masih terdapat sebagian kecil lemak yang belum terekstrak oleh larutan pengestrak lemak (n-heksana), dalam penelitian ini dilakukan pengulangan hingga dua kali. Hal ini merujuk pada percobaan sebelumnya yang menunjukkan bahwa proses penghilangan lemak tersebut belum sempurna jika hanya dilakukan sekali (Subagja, 2009). Kandungan flavonoid (termasuk katekin dan epikatekin) larut ke dalam larutan pengestrak yaitu larutan campuran metanol 4 ml dan air 1 ml. Hasil ekstraksi dalam larutan campuran metanol-air tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml kemudian ditambahkan larutan metanol 30 % sampai tanda batas agar dapat dihitung kadarnya secara kuantitatif.

4.7.2 Analisis kuantitatif katekin dan epikatekin

Hasil ekstraksi di atas kemudian disaring dengan membran Millipore 0,45 μm . Hasil saringan dimasukkan ke dalam botol cokelat ukuran 10 ml. Kemudian sebanyak 20 μl disuntikkan ke KCKT untuk ditetapkan kadar katekin dan epikatekinnya. Area dicatat dan dihitung menggunakan persamaan regresi dari kurva kalibrasi. Sampel yang dihitung kadarnya adalah nib kakao, pasta kakao, dan bubuk kakao. Proses ekstraksi dan analisis kuantitatif katekin dan epikatekin dilakukan sebanyak tiga kali untuk masing-masing sampel.

Sampel nib kakao adalah sampel biji kakao yang telah dihilangkan kulitnya. Untuk mendapatkan sampel ini, hanya ada proses pengeringan pada 60 $^{\circ}\text{C}$ serta proses penggilingan ringan. Selanjutnya sampel nib ini dijadikan pasta menggunakan mesin giling. Proses penggilingan pada tahap ini lebih kuat dibanding proses penggilingan untuk mendapatkan nib. Terakhir adalah proses

pengepresan untuk memisahkan antara bubuk kakao dan lemak kakao. Pada tahap terakhir ini, diberikan proses pengepresan dilakukan pada suhu 60-70 °C (Subagja, 2009).

Pengukuran kadar katekin dan epikatekin dilakukan dengan cara mencatat area yang dihasilkan, kemudian kadar kedua zat tersebut dihitung menggunakan persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi. Kadar katekin dan epikatekin dalam nib kakao berturut-turut adalah $1,6060 \pm 0,0309 \mu\text{g}/\text{mg}$ dan $3,7060 \pm 0,0696 \mu\text{g}/\text{mg}$. Rasio kedua zat ini dalam nib kakao adalah (1:2,31). Kadar katekin dan epikatekin dalam pasta kakao berturut-turut adalah $3,0119 \pm 0,0557 \mu\text{g}/\text{mg}$ dan $6,7099 \pm 0,1074 \mu\text{g}/\text{mg}$. Rasio kedua zat ini dalam pasta kakao adalah (1:2,23). Kadar katekin dan epikatekin dalam bubuk kakao berturut-turut adalah $3,7597 \pm 0,0622 \mu\text{g}/\text{mg}$ dan $7,6271 \pm 0,1347 \mu\text{g}/\text{mg}$. Rasio kedua zat ini dalam bubuk kakao adalah (1:2,03). Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.10 dan 4.11. Gambar ekstrak sampel dapat dilihat pada gambar 4.20. Kromatogram sampel dapat dilihat pada gambar 4.21 – 4.23.

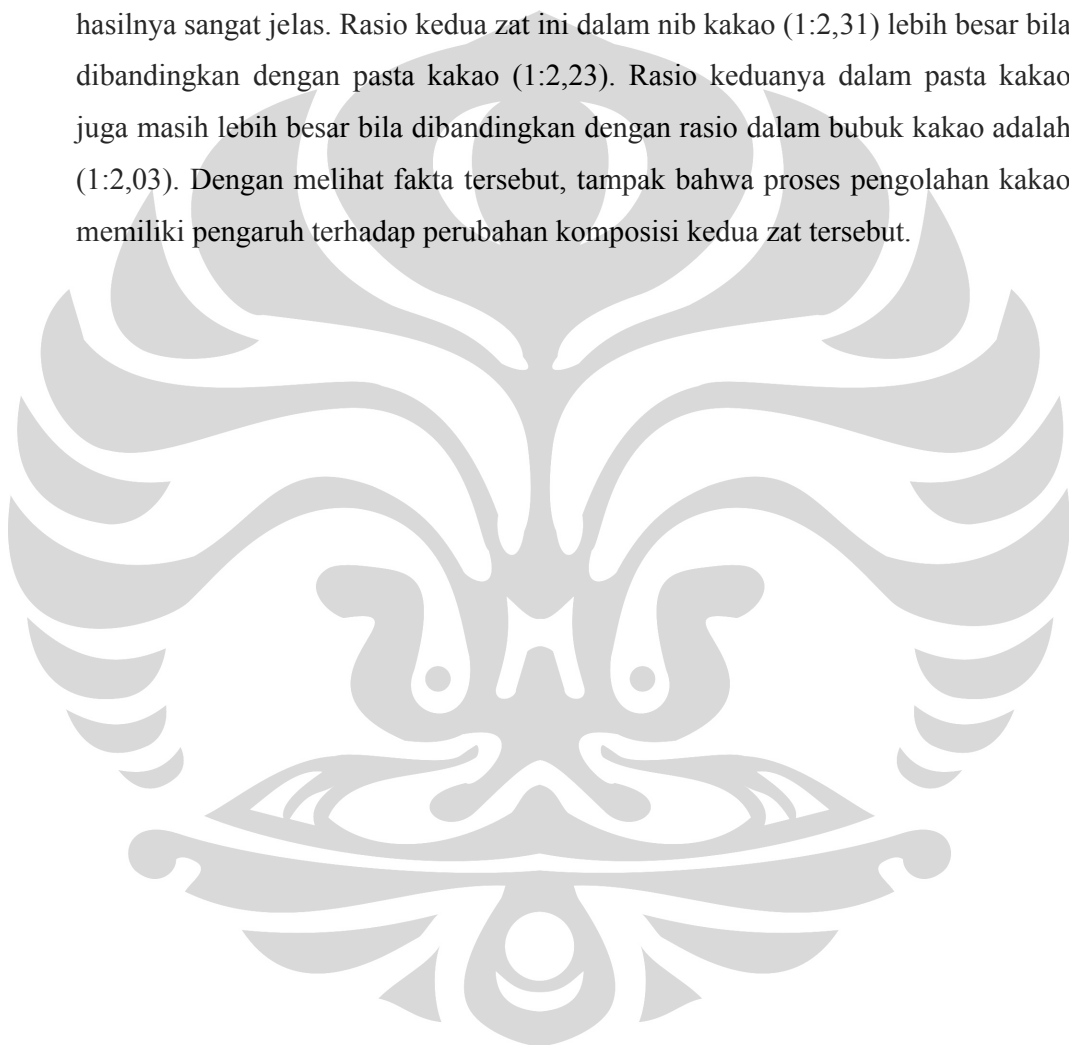
Sepintas terlihat bahwa kadar katekin dan epikatekin semakin meningkat dengan adanya pengolahan dari nib kakao sampai bubuk kakao. Ini tidak sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa pengolahan kakao menyebabkan terjadinya penurunan kadar polifenol (termasuk katekin dan epikatekin) dalam sampel (Wollgast, 2004; Kofink, Papagiannopoulos, dan Galensa, 2007; serta Subagja, 2009).

Untuk menjelaskan fenomena tersebut, ada kemungkinan yang dapat diajukan adalah sebagai berikut: (1) Masih terikutnya kulit biji ke dalam sampel nib. Akibatnya kadar katekin dan epikatekin dalam nib lebih kecil bila dibandingkan kadar kedua zat tersebut dalam pasta kakao. (2) Akibat adanya perbedaan basis penimbangan. Adanya perbedaan basis ini menyebabkan kadar katekin dan epikatekin dalam pasta lebih kecil bila dibandingkan dengan kadar kedua zat tersebut dalam bubuk kakao (Subagja, 2009).

Metode lain yang juga dapat digunakan untuk menilai pengaruh proses pengolahan kakao adalah dengan melihat rasio/perbandingan antara katekin dengan epikatekin (Kofink, Papagiannopoulos, dan Galensa, 2007; dan Subagja,

2009). (-)-Epikatekin mudah terepimerisasi menjadi (-)-katekin karena beberapa perlakuan panas selama proses pengolahan biji kakao menjadi produk-produk olahannya. Adanya epimerisasi ini dapat diamati secara tidak langsung melalui perubahan komposisi katekin dan epikatekin. Kadar katekin akan bertambah sementara itu kadar epikatekin akan berkurang (Subagja, 2009).

Jika rasio antara katekin dan epikatekin ini yang dijadikan acuan, maka hasilnya sangat jelas. Rasio kedua zat ini dalam nib kakao (1:2,31) lebih besar bila dibandingkan dengan pasta kakao (1:2,23). Rasio keduanya dalam pasta kakao juga masih lebih besar bila dibandingkan dengan rasio dalam bubuk kakao adalah (1:2,03). Dengan melihat fakta tersebut, tampak bahwa proses pengolahan kakao memiliki pengaruh terhadap perubahan komposisi kedua zat tersebut.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Kondisi analisis optimum penetapan kadar katekin dan epikatekin secara KCKT dengan detektor ultraviolet adalah dengan menggunakan fase diam kolom Kromasil C-18 10-5, fase gerak air/asetonitril/asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), dan laju alir 1,0 ml/menit, serta dideteksi pada panjang gelombang 280 nm.
2. Secara umum metode analisis penetapan kadar katekin dan epikatekin tersebut memenuhi syarat parameter-parameter validasi yang ditetapkan yaitu uji spesifitas dan selektivitas, kurva kalibrasi dan uji linearitas, pengukuran batas deteksi dan batas kuantitasi, serta uji presisi dan uji perolehan kembali.
3. Kadar katekin dan epikatekin dalam sampel hasil olahan biji kakao berturut-turut adalah $1,6060 \pm 0,0309 \mu\text{g/mg}$ dan $3,7060 \pm 0,0696 \mu\text{g/mg}$ (nib kakao); $3,0119 \pm 0,0557 \mu\text{g/mg}$ dan $6,7099 \pm 0,1074 \mu\text{g/mg}$ (pasta kakao); serta $3,7597 \pm 0,0622 \mu\text{g/mg}$ dan $7,6271 \pm 0,1347 \mu\text{g/mg}$ (bubuk kakao).

5.2 Saran

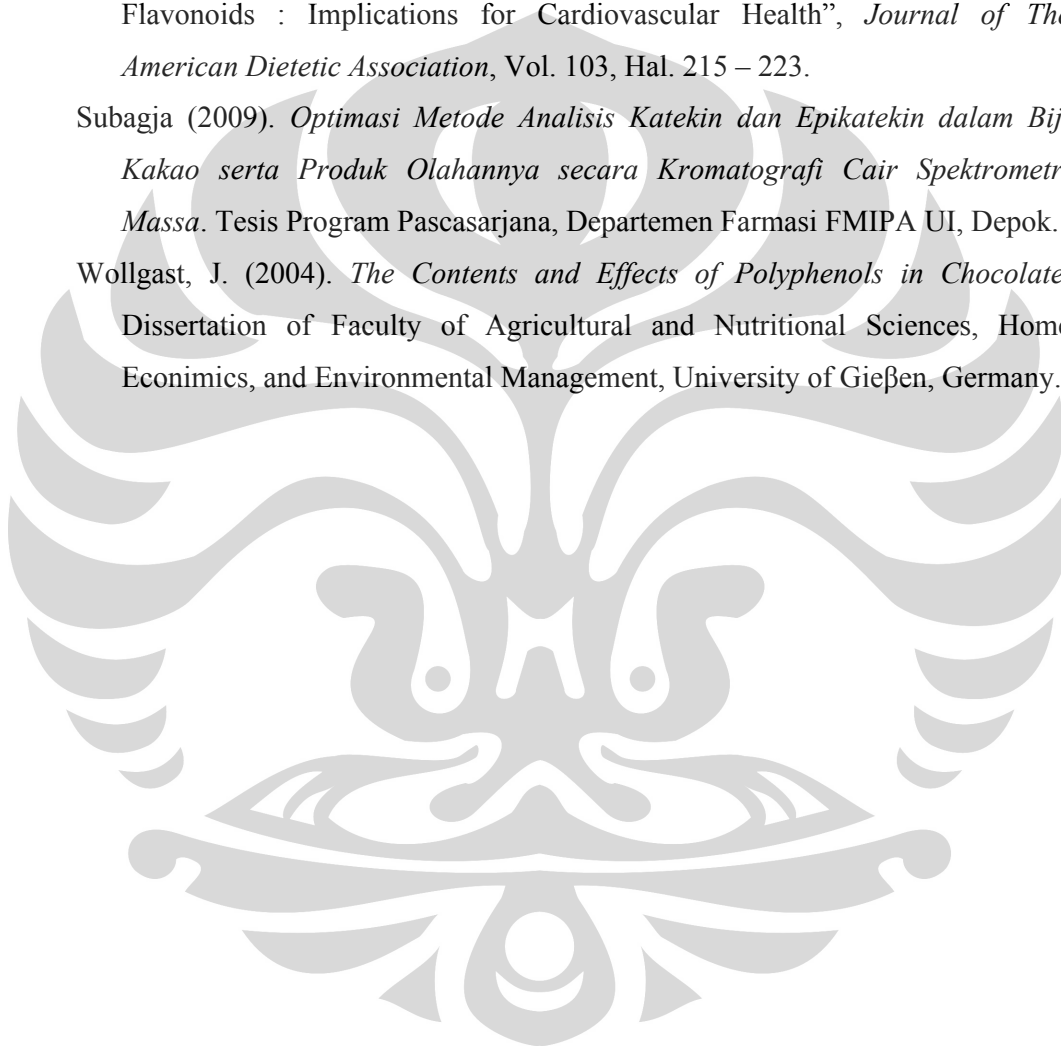
Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk didapatkan pemisahan katekin dan epikatekin yang lebih baik lagi dengan menggunakan gradien elusi.

DAFTAR ACUAN

- Brito, Eddy Sousa; Garcia, Nelson Horacio Pezoa; dan Amancio, Allan Cesar. (2002). "Effects of Polyphenol Oxidase (PPO) and Air Treatments on Total Phenol and Tannin Content of Cocoa Nibs". *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas*, Vol. 22, No. 1, Hal. 45-48. Di dalam: Subagja (2009). *Optimasi Metode Analisis Katekin dan Epikatekin dalam Biji Kakao serta Produk Olahannya secara Kromatografi Cair Spektrometri Massa*. Tesis Program Pascasarjana, Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok.
- FAO (2005). "Food and Agricultural commodities production, Countries by commodity, Cocoa Beans". Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=en&item=661&year=2005>, (15 Jan. 2010, pukul 20.59 WIB.)
- Goenadi, D.H., *et al.* (2005). *Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Kakao di Indonesia*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian, Jakarta.
- Harmita (2006a). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok.
- Harmita (2006b). *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok.
- Johnson, E.L. dan Stevenson, R. (1991). *Dasar Kromatografi Cair*. Terj. K. Padmawinata. Penerbit ITB, Bandung. Hal. 2 – 15 dan 213 – 321.
- Jones, Samuel B., dan Luchsinger, Arlene E. (1987). *Plant Systematics*. International edition. Mc-Graw Hill Book Co., Singapore. Hal. 335-337.
- Keen, Carl I., *et al.* (2005). "Cocoa Antioxidants and Cardiovascular Health". *The American Journal of Clinical Nutrition*, No. 81(suppl), Hal. 298S-303S.
- Kofink, Michael; Papagiannopoulos, Menelaos; and Galensa, Rudolf. (2007). *(-)-Catechin in Cocoa and Chocolate: Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-ol Enantiomer*. University of Bonn, Department of Nutrition and Food Sciences, Research Area: Food Chemistry I, Endenicher Allee 11-13, Bonn, Germany.

- LECO Corporation (2006). *Rapid Screening for Flavonoids in Cocoa Using LC-TOFMS*. Leco Corporation, Form No. 203-821-294 8/06-REVO.
- Meng, Cheng Chia; Jalil, Abbe Maleyki Mhd.; dan Ismail, Amin. (2008). *Phenolic and Theobromine Contents of Commercial Dark, Milk and White Chocolates on the Malaysian Market*. Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Putra Malaysia 43400, UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia.
- Miyashita, Naoto; Kotani, Akira; dan Kusu, Fumiyo. (2001). *High-Sensitive Determination of Catechins by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection*. School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Japan.
- Natsume, *et al.* (2000). "Analyses of Polyphenols in Cacao Liquor, Cocoa, and Chocolate by Normal-Phase and Reversed-Phase HPLC". *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 12, No. 64, Hal. 2581-2587.
- Olson, J. (2004). *Belajar Mudah Farmakologi*. Penerj. Linda Chandranata. Jakarta, EGC. Hal. 95-100.
- Perluas Areal Tanaman Kakao di Indonesia Barat (2009). <http://bataviase.co.id/node/12448>, (15 Jan. 2010, pukul 20.03 WIB.)
- Rein, D., *et al.* (2000b). "Epicatechin in Human Plasma: In Vivo Determination and Effect of Chocolate Consumption on Plasma Oxidation Status". *The Journal of Nutrition*, No. 130 (suppl), Hal. 2109S – 2114S.
- Rein, D., *et al.* (2000a). "Cocoa Inhibits Platelet Activation and Function", *The American Journal of Clinical Nutrition*, No. 72, Hal. 30 – 35.
- Romanczyk, L.J., *et al.* (1997). "Cocoa Extract Compounds and Methods for Making and Using the Same". Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 97/36497, USA, MARS Incorporated. Di dalam: Wollgast, J. (2004). *The Contents and Effects of Polyphenols in Chocolate*. Dissertation of Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Home Economics, and Environmental Management, University of Gießen, Germany.
- Roy, H., Lundy, S., dan Brantley, P. (2005). *Cocoa Polyphenols*. Pennington Biomedical Research Center.

- Sanbongi, S., *et al.* (1998). "Antioxidative Poliphenols Isolated from *Theobroma cacao*", *Jurnal Agric. Food Chem.*, No. 46, Hal. 454 – 457.
- Schramm, D.D., *et al.* (2001). "Chocolate Procyanidins Decrease the Leucotriene/ Prostacyclin Ratio in Humans and Human Aortic Endothelial Cells", *The American Journal of Clinical Nutrition*, No. 73, Hal. 36 – 40.
- Steinberg, F.M.; Bearden, M.M.; dan Keen, C.L. (2003). "Cocoa and Chocolate Flavonoids : Implications for Cardiovascular Health", *Journal of The American Dietetic Association*, Vol. 103, Hal. 215 – 223.
- Subagja (2009). *Optimasi Metode Analisis Katekin dan Epikatekin dalam Biji Kakao serta Produk Olahannya secara Kromatografi Cair Spektrometri Massa*. Tesis Program Pascasarjana, Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok.
- Wollgast, J. (2004). *The Contents and Effects of Polyphenols in Chocolate*. Dissertation of Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Home Economics, and Environmental Management, University of Gießen, Germany.





Keterangan :

- (a) pompa LC 6-A
- (b) injektor
- (c) kolom (Kromasil) C18 fase terbalik (25 x 0,46 cm)
- (d) detektor UV SPD 10-A VP
- (e) pengolah data Shimadzu C-R4A Chromatopac

Gambar 3.1 Alat kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu)

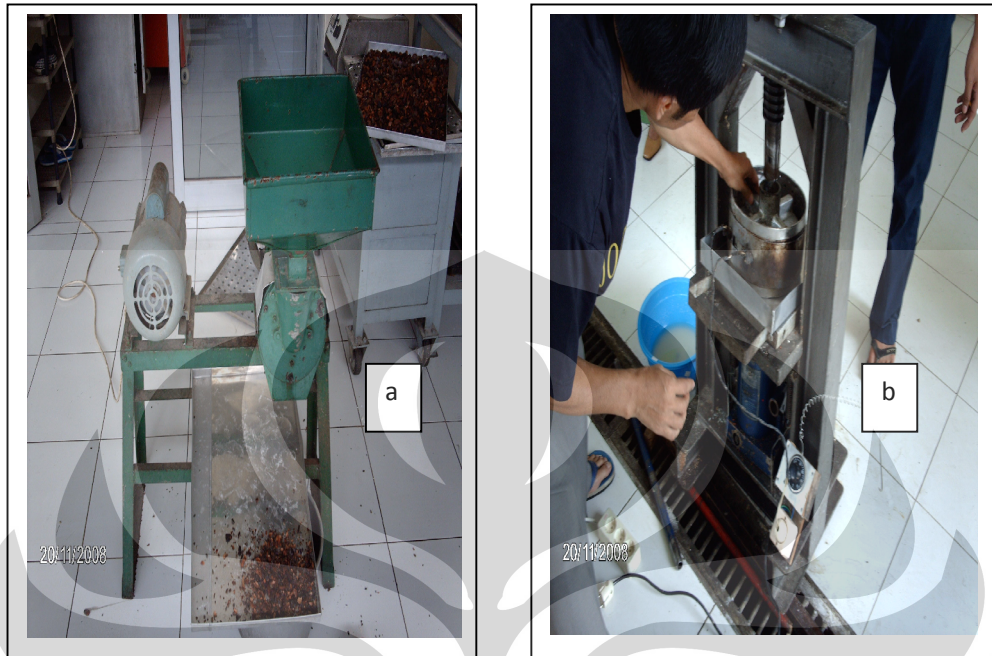


Keterangan :

(a) seperangkat komputer pengolah data

(b) alat spektrofotometer UV-Vis Jasco V-630

Gambar 3.2 Alat spektrofotometer UV-Vis Jasco V-630

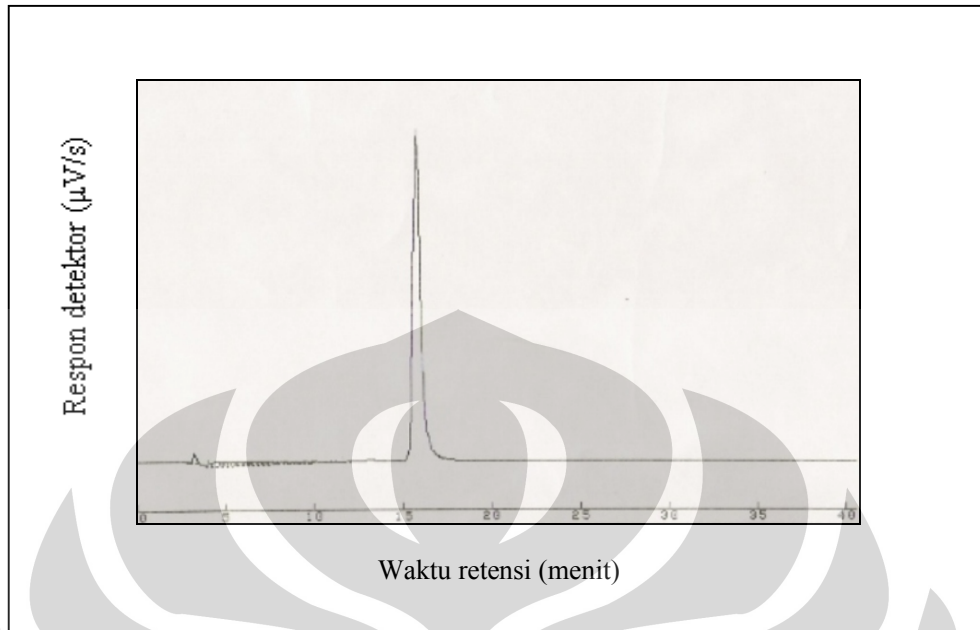


Keterangan :

(a) mesin penggiling (lokal)

(b) pengempa hidrolis (lokal)

Gambar 3.3 Alat yang digunakan untuk mengolah biji kakao
[Sumber: Subagja, 2009]



Gambar 4.1 : Kromatogram katekin 103,95 ppm dalam pelarut metanol 30 % pada kondisi analisis optimum

Kondisi analisis :

Volume penyuntikan : 20 μl

Fase gerak : air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v)

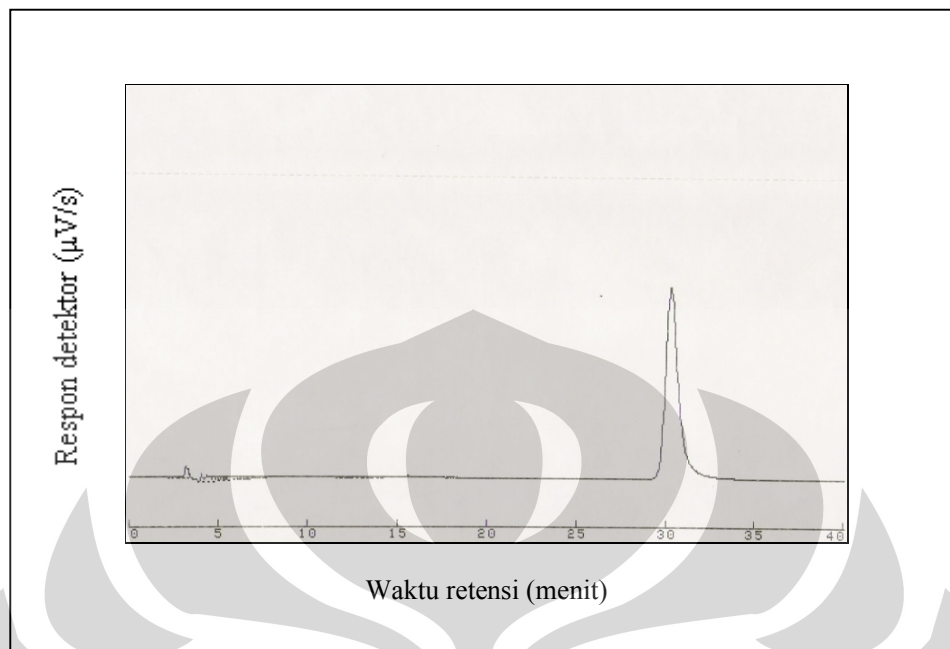
Kecepatan alir : 1,0 ml/menit

Detektor UV : 280 nm

Keterangan :

Waktu retensi : 16,552 menit

Area : 2226501 $\mu\text{V/s}$



Gambar 4.2 : Kromatogram epikatekin 100,416 ppm dalam pelarut metanol 30 % pada kondisi analisis optimum

Kondisi analisis :

Volume penyuntikan : 20 µl

Fase gerak : air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v)

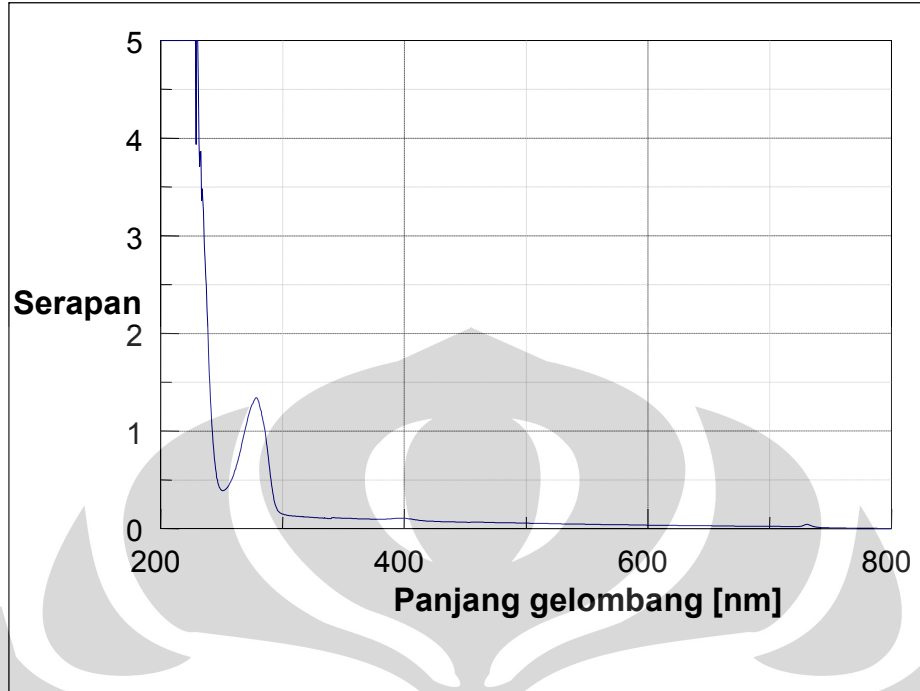
Kecepatan alir : 1,0 ml/menit

Detektor UV : 280 nm

Keterangan :

Waktu retensi : 32,469 menit

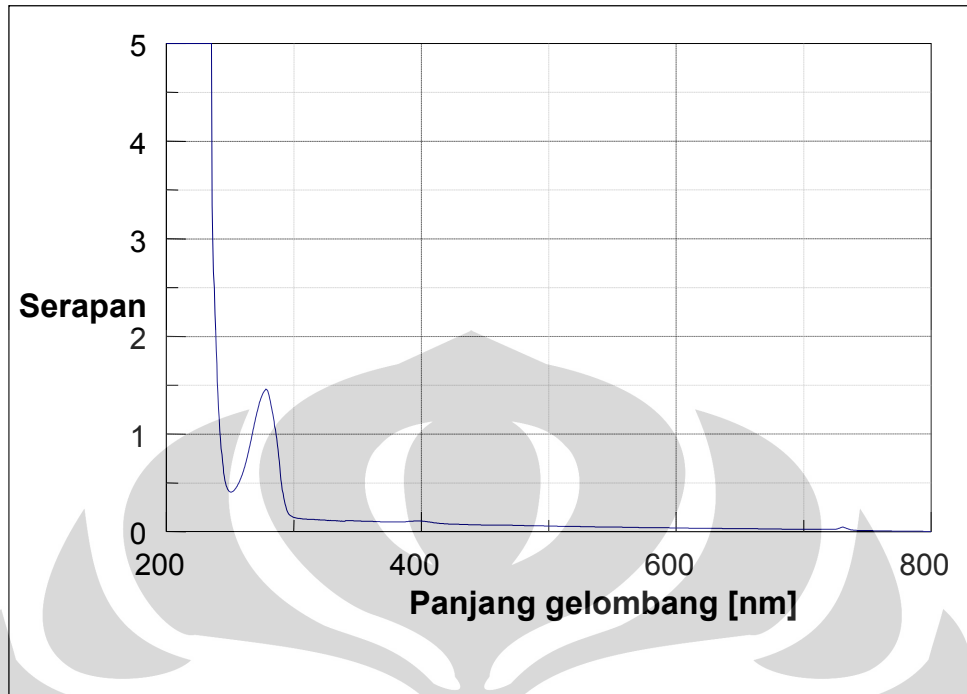
Area : 1681266 µV/s



Keterangan :

Panjang gelombang maksimum : 278 nm

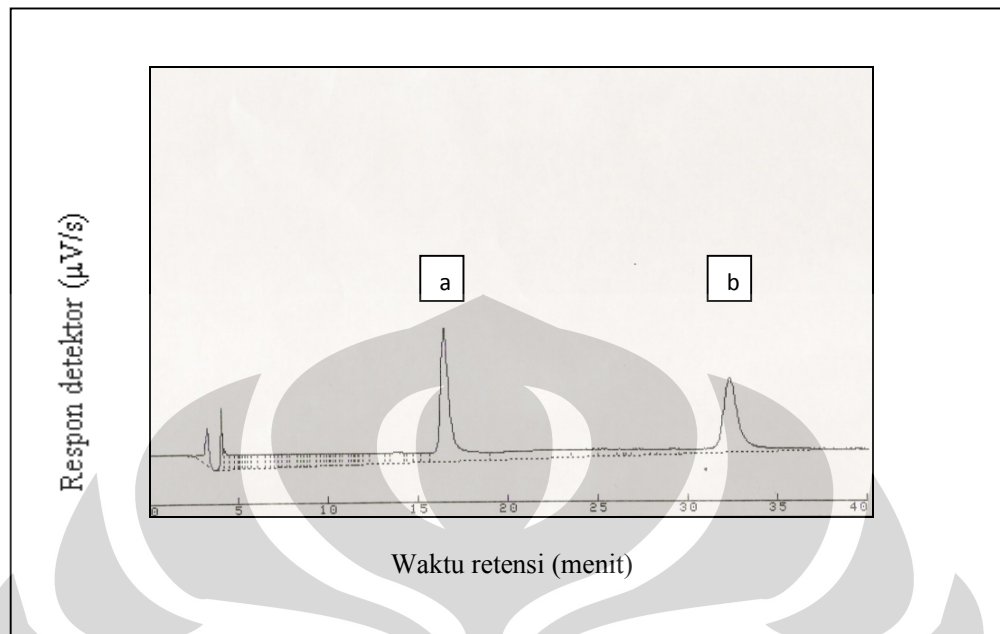
Gambar 4.3 Spektrum serapan katekin 100 ppm dalam pelarut metanol 30 %



Keterangan :

Panjang gelombang maksimum : 278,5 nm

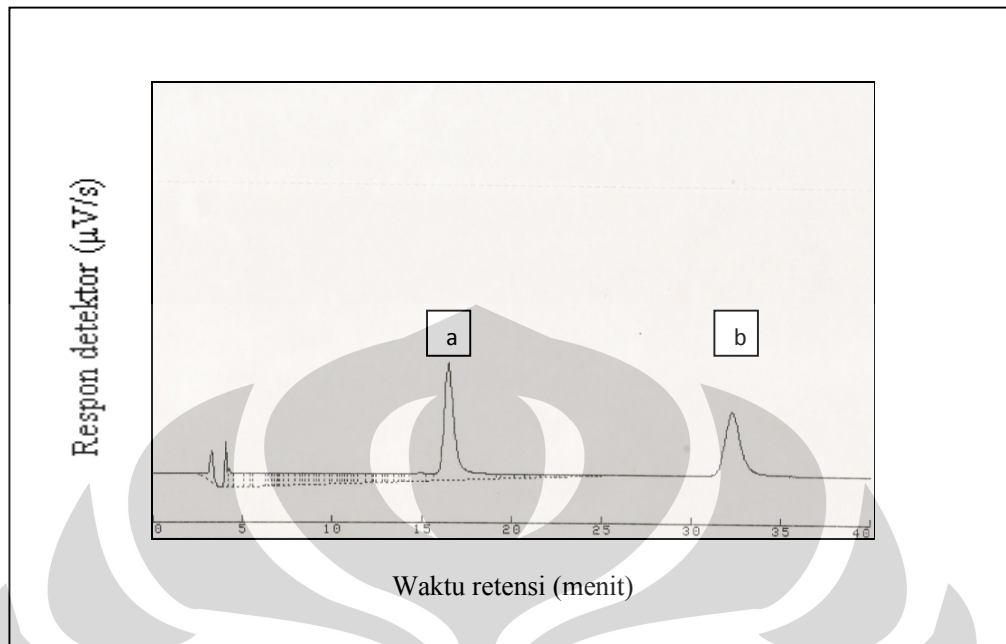
Gambar 4.4 Spektrum serapan epikatekin 100 ppm dalam pelarut metanol 30 %



Keterangan :

a. Katekin	$t_R = 16,442$ menit	Area = 928342 $\mu\text{V/s}$
b. Epikatekin	$t_R = 32,356$ menit	Area = 705295 $\mu\text{V/s}$

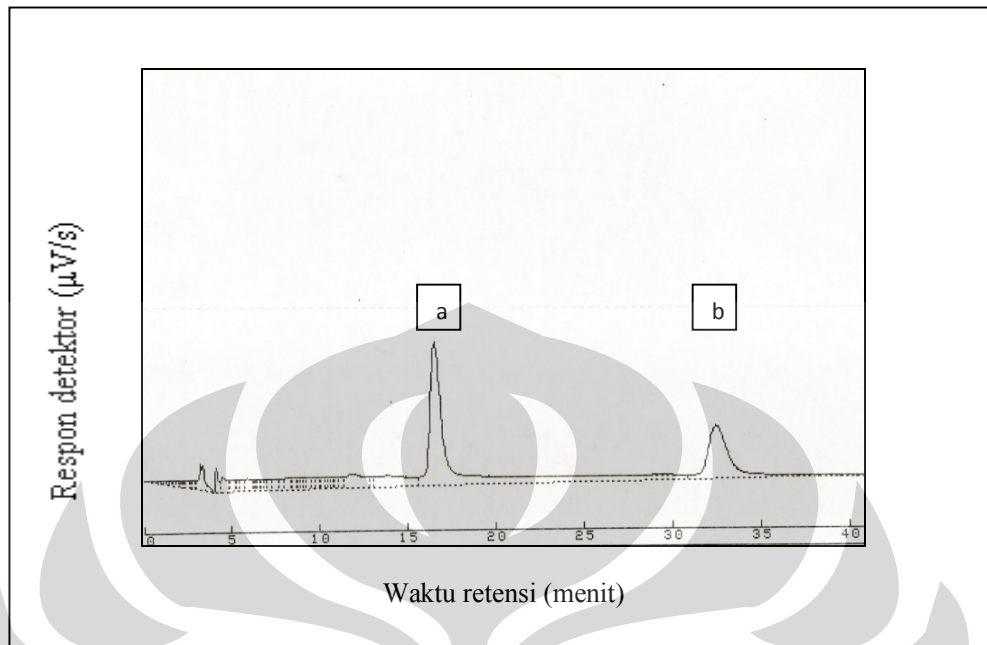
Gambar 4.5 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 278 nm



Keterangan :

a. Katekin	$t_R = 16,447$ menit	Area = 941177 $\mu\text{V/s}$
b. Epikatekin	$t_R = 32,361$ menit	Area = 710896 $\mu\text{V/s}$

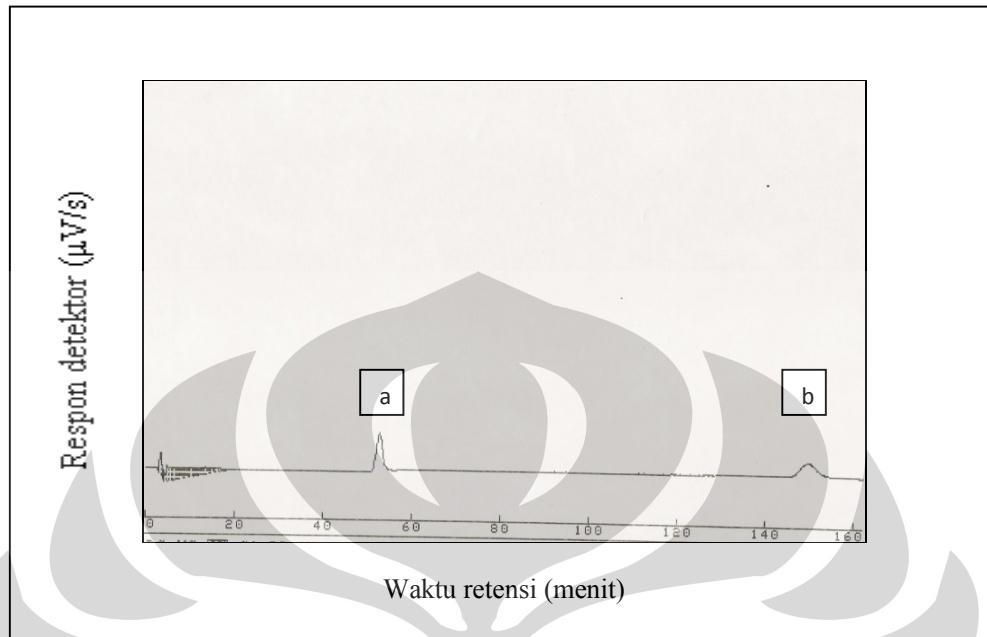
Gambar 4.6 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 279 nm



Keterangan :

a. Katekin	$t_R = 16,552$ menit	Area = 969565 $\mu\text{V/s}$
b. Epikatekin	$t_R = 32,469$ menit	Area = 715046 $\mu\text{V/s}$

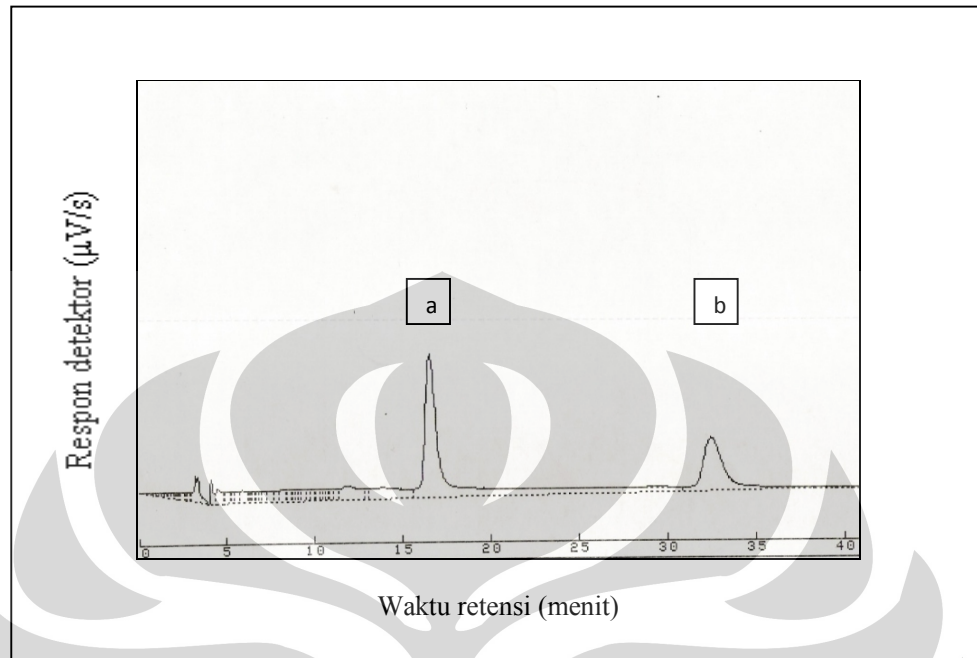
Gambar 4.7 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm



Keterangan :

a. Katekin	$t_R = 55,622$ menit	Area = 725524 $\mu\text{V/s}$
b. Epikatekin	$t_R = 150,863$ menit	Area = 511463 $\mu\text{V/s}$

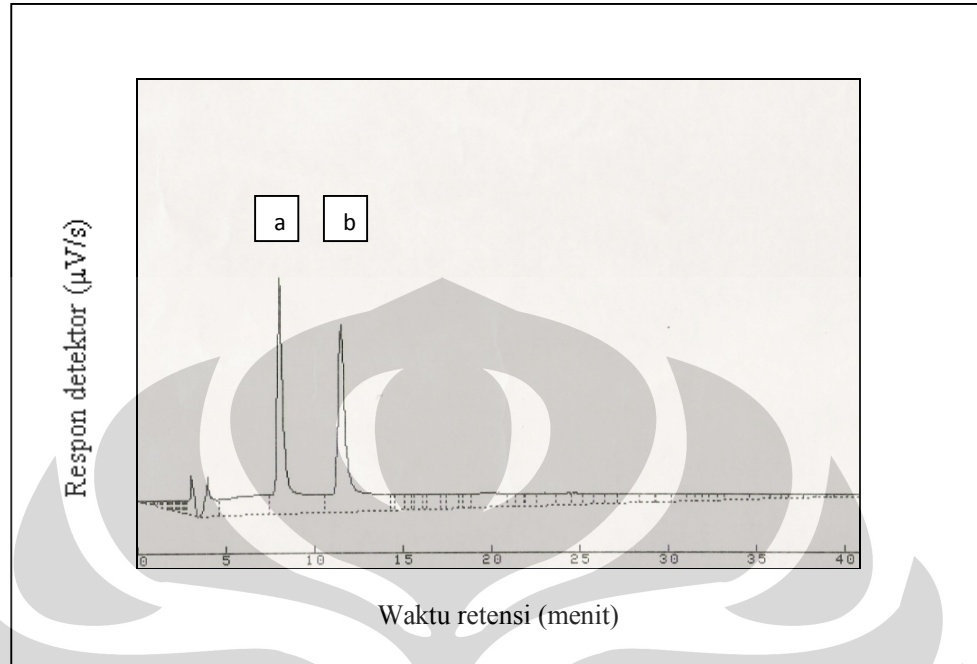
Gambar 4.8 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (95:5:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm



Keterangan :

- | | | |
|---------------|----------------------|-------------------------------|
| a. Katekin | $t_R = 16,552$ menit | Area = 969565 $\mu\text{V/s}$ |
| b. Epikatekin | $t_R = 32,469$ menit | Area = 715046 $\mu\text{V/s}$ |

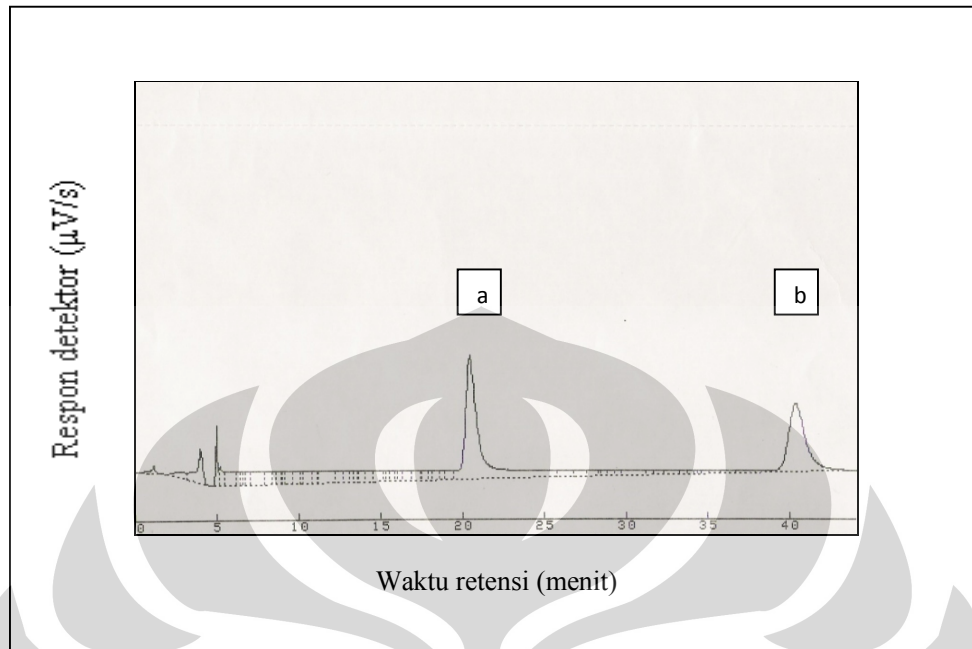
Gambar 4.9 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm



Keterangan :

- | | | |
|---------------|----------------------|--------------------------------|
| a. Katekin | $t_R = 8,017$ menit | Area = 1230699 $\mu\text{V/s}$ |
| b. Epikatekin | $t_R = 11,519$ menit | Area = 1240895 $\mu\text{V/s}$ |

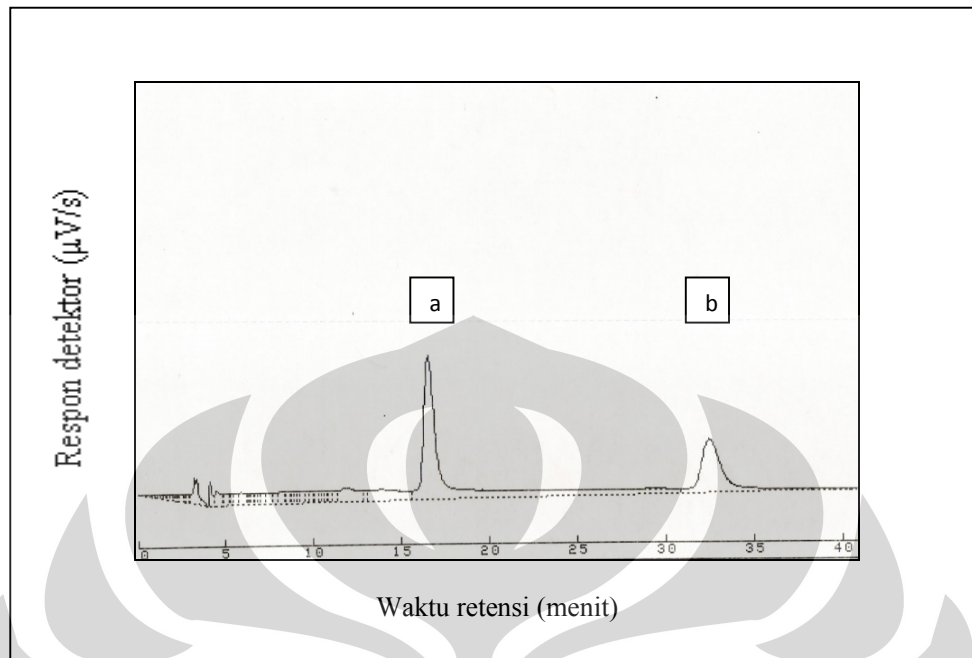
Gambar 4.10 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (85:15:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm



Keterangan :

a. Katekin	$t_R = 20,474$ menit	Area = 1293587 $\mu\text{V/s}$
b. Epikatekin	$t_R = 40,387$ menit	Area = 823094 $\mu\text{V/s}$

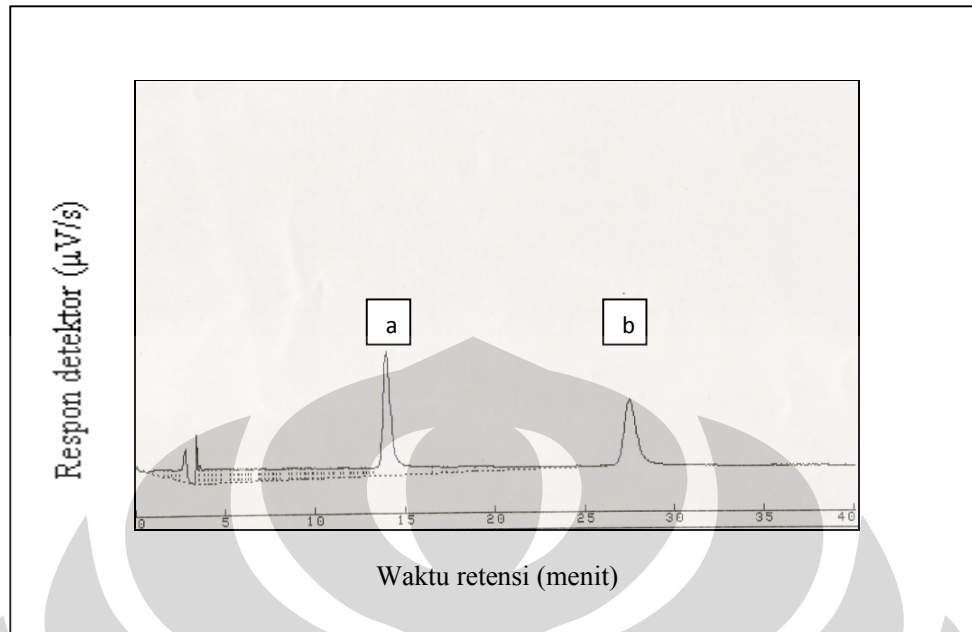
Gambar 4.11 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 0,8 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm



Keterangan :

a. Katekin	$t_R = 16,552$ menit	Area = 969565 $\mu\text{V/s}$
b. Epikatekin	$t_R = 32,469$ menit	Area = 715046 $\mu\text{V/s}$

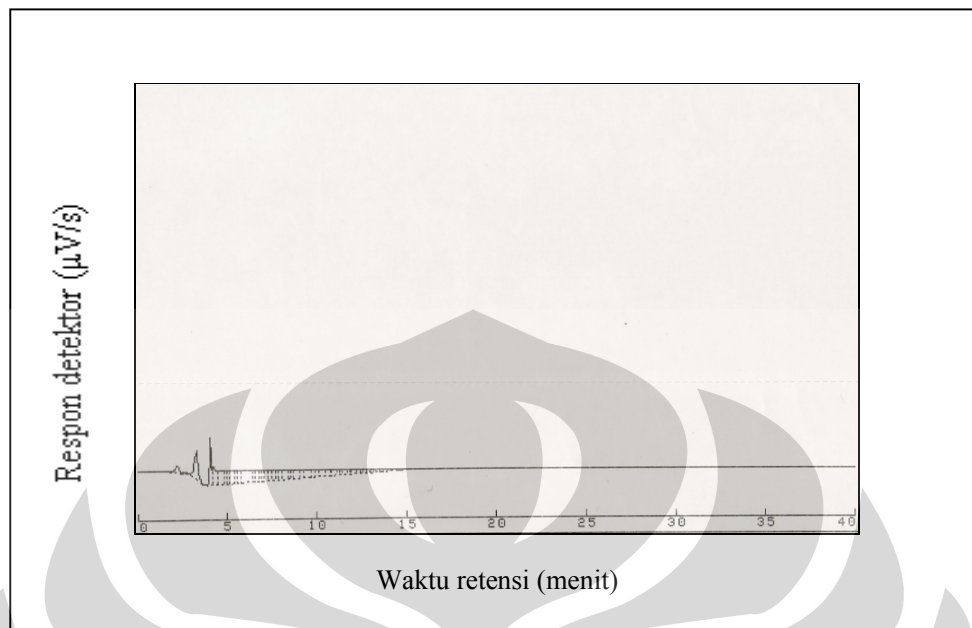
Gambar 4.12 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm



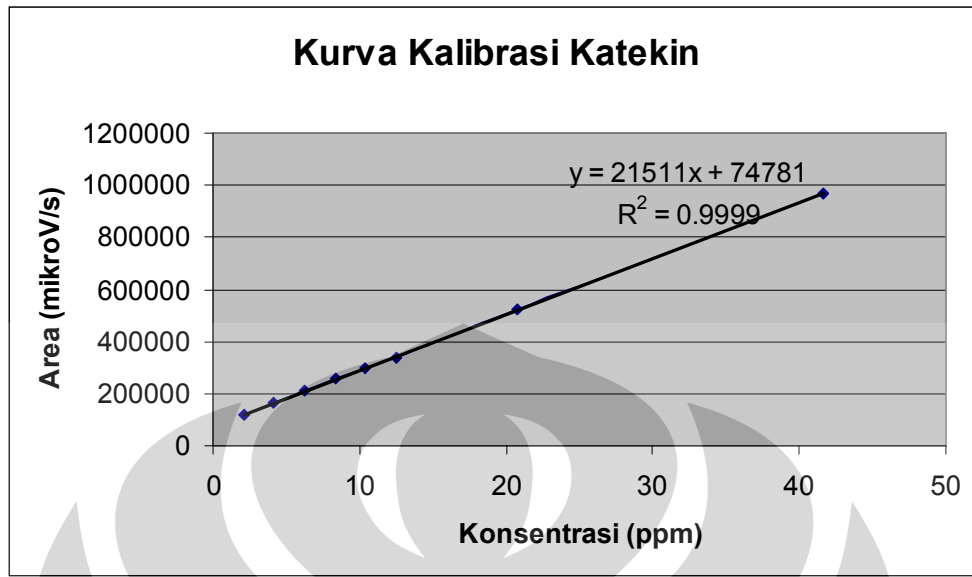
Keterangan :

a. Katekin	$t_R = 13,973$ menit	Area = 801313 $\mu\text{V/s}$
b. Epikatekin	$t_R = 28,034$ menit	Area = 621182 $\mu\text{V/s}$

Gambar 4.13 Kromatogram larutan katekin dan epikatekin 40 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,2 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm



Gambar 4.14 Kromatogram larutan metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm



Gambar 4.15 Kurva kalibrasi katekin

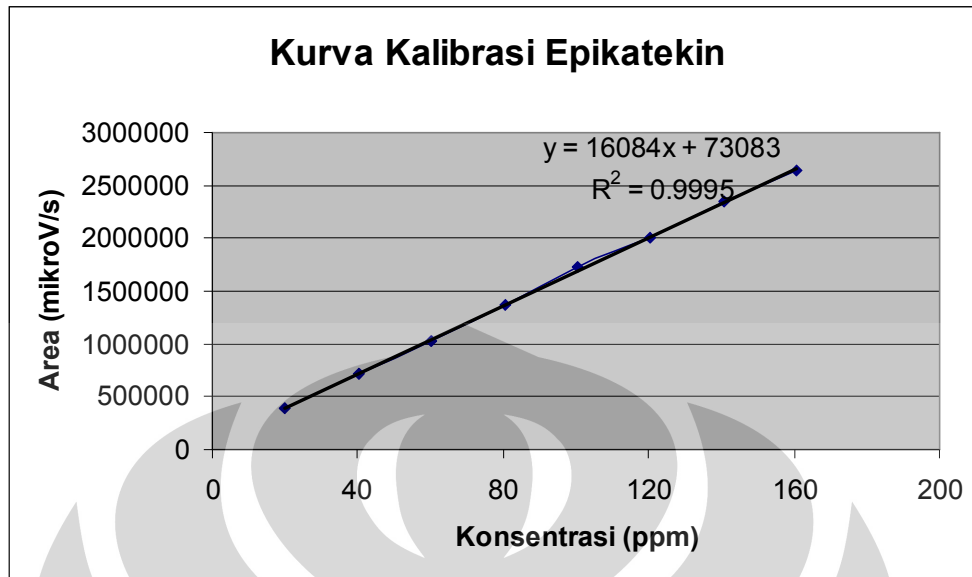
Kondisi analisis :

Volume penyuntikan : 20 μ l

Fase gerak : air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v)

Kecepatan alir : 1,0 ml/menit

Detektor UV : 280 nm



Gambar 4.16 Kurva kalibrasi epikatekin

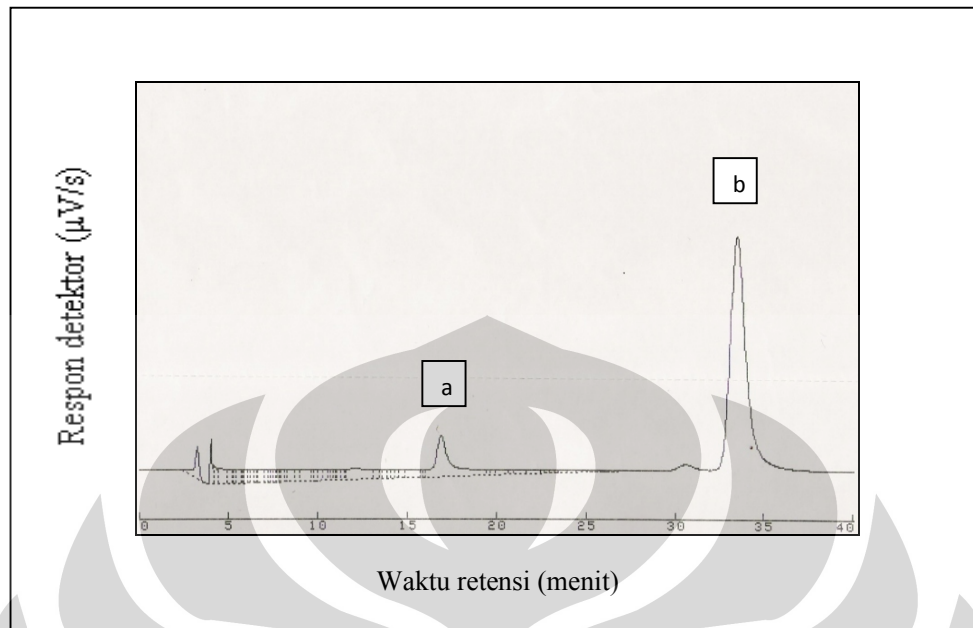
Kondisi analisis :

Volume penyuntikan : 20 μ l

Fase gerak : air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v)

Kecepatan alir : 1,0 ml/menit

Detektor UV : 280 nm



Keterangan :

a. Katekin	$t_R = 16,892$ menit	Area = 339556 $\mu\text{V/s}$
b. Epikatekin	$t_R = 33,811$ menit	Area = 2633257 $\mu\text{V/s}$

Gambar 4.17 Kromatogram larutan katekin 12 ppm dan epikatekin 160 ppm dalam pelarut metanol 30 % dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit, panjang gelombang 280 nm



Gambar 4.18 Sampel biji kakao yang mengandung katekin dan epikatekin

[Sumber: Subagja, 2009]



Keterangan :

- (a) nib kakao
- (b) pasta kakao
- (c) bubuk kakao

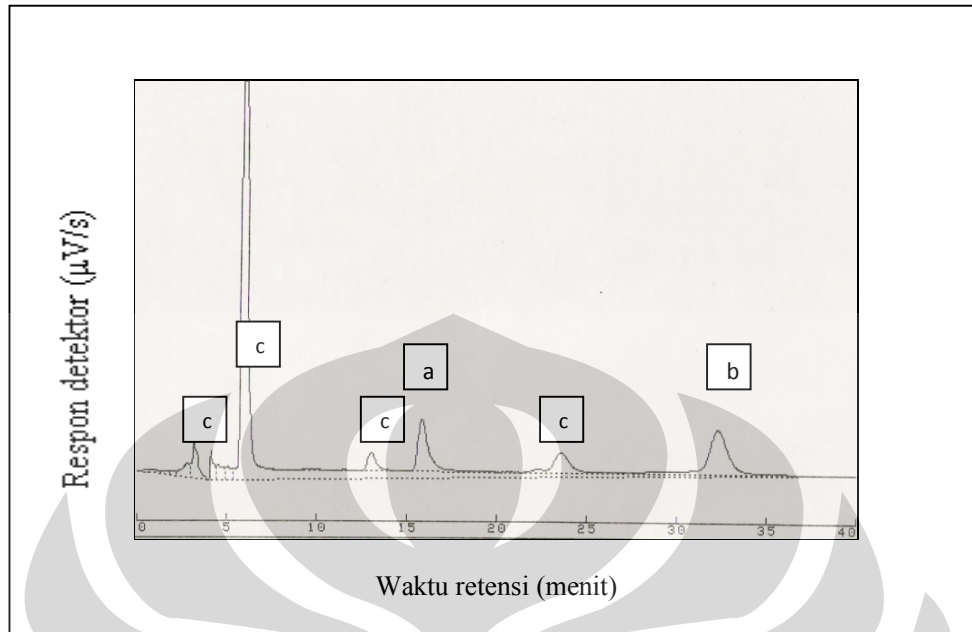
Gambar 4.19 Hasil olahan biji kakao yang mengandung katekin dan epikatekin



Keterangan :

- (a) ekstrak nib kakao
- (b) ekstrak pasta kakao
- (c) ekstrak bubuk kakao

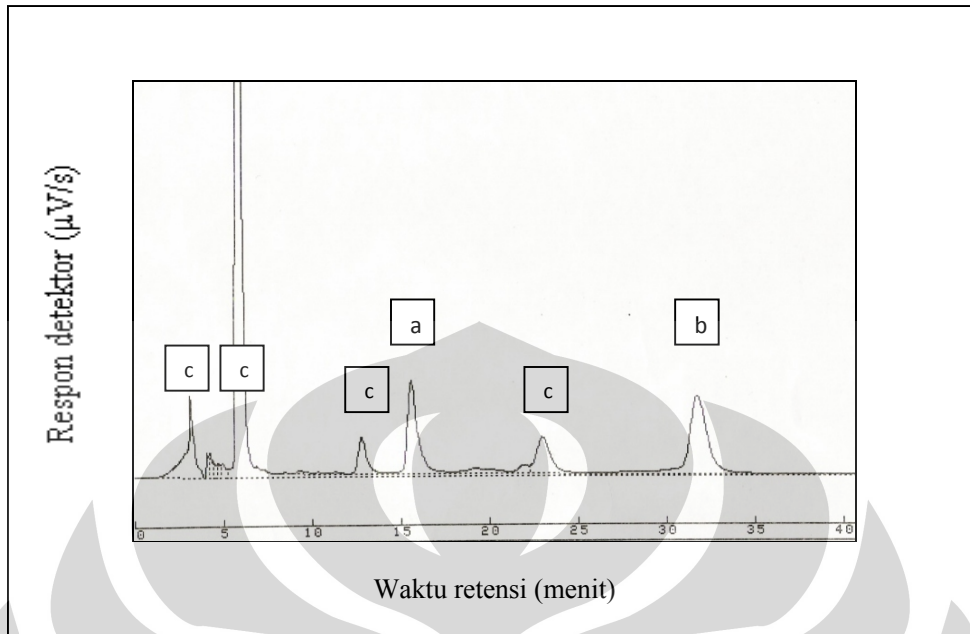
Gambar 4.20 Hasil ekstraksi biji kakao yang mengandung katekin dan epikatekin



Keterangan :

- | | | |
|--------------------|----------------------|-------------------------------|
| a. Katekin | $t_R = 16,024$ menit | Area = 353253 $\mu\text{V/s}$ |
| b. Epikatekin | $t_R = 32,298$ menit | Area = 561624 $\mu\text{V/s}$ |
| c. Tidak diketahui | | |

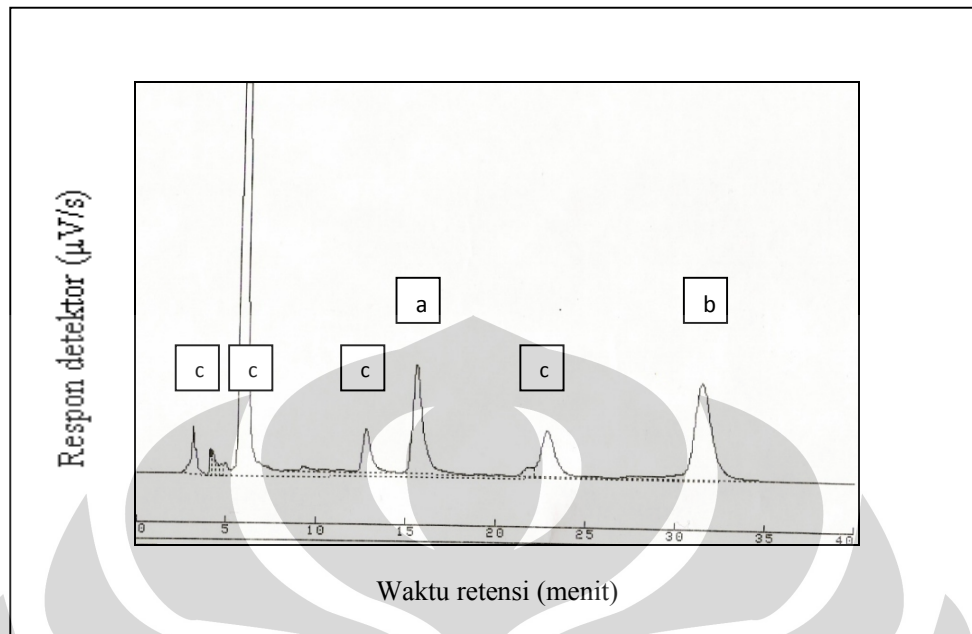
Gambar 4.21 Kromatogram katekin (a) dan epikatekin (b) dalam sampel nib kakao dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm



Keterangan :

- | | | |
|--------------------|----------------------|-------------------------------|
| a. Katekin | $t_R = 16,091$ menit | Area = 603856 $\mu\text{V/s}$ |
| b. Epikatekin | $t_R = 32,705$ menit | Area = 945949 $\mu\text{V/s}$ |
| c. Tidak diketahui | | |

Gambar 4.22 Kromatogram katekin (a) dan epikatekin (b) dalam sampel pasta kakao dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm



Keterangan :

- | | | |
|--------------------|----------------------|--------------------------------|
| a. Katekin | $t_R = 16,026$ menit | Area = 722201 $\mu\text{V/s}$ |
| b. Epikatekin | $t_R = 32,416$ menit | Area = 1059622 $\mu\text{V/s}$ |
| c. Tidak diketahui | | |

Gambar 4.23 Kromatogram katekin (a) dan epikatekin (b) dalam sampel bubuk kakao dengan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm

Tabel 4.1

Data waktu retensi, area, ukuran efisiensi kolom, dan jumlah pelat teoritis katekin dan epikatekin pada berbagai kondisi

Pemilihan panjang gelombang pada detektor ultraviolet

No.	Standar	Konsentrasi	Panjang Gelombang (nm)	tR (menit)	Area ($\mu\text{v/s}$)	w (menit)	N (pelat)	HETP
		(ppm)						(cm/pelat)
1	Katekin	41,5800	278	16,442	928342	1,7588	1398,2871	0,0179
	Epikatekin	40,1664						32,356
2	Katekin	41,5800	279	16,447	941177	1,7622	1393,7439	0,0179
	Epikatekin	40,1664						32,361
3	Katekin	41,5800	280	16,552	969565	1,7647	1407,5997	0,0178
	Epikatekin	40,1664						32,469

Optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak

No.	Standar	Konsentrasi	Fase Gerak	tR (menit)	Area ($\mu\text{v/s}$)	w (menit)	N (pelat)	HETP
		(ppm)						(cm/pelat)
1	Katekin	41,5800	Air-Asetonitril-TFA 4% = (95:5:1)	55,622	725524	4,7059	2235,2587	0,0112
	Epikatekin	40,1664						150,863
2	Katekin	41,5800	Air-Asetonitril-TFA 4% = (90:10:1)	16,552	969565	1,7647	1407,5997	0,0178
	Epikatekin	40,1664						32,469
3	Katekin	41,5800	Air-Asetonitril-TFA 4% = (85:15:1)	8,017	1230699	1,2903	617,6783	0,0405
	Epikatekin	40,1664						11,515

Lanjutan

Optimasi terhadap perubahan laju alir

No.	Standar	Konsentrasi		HETP				
		(ppm)	Laju Alir (ml/menit)	tR (menit)	Area ($\mu\text{v/s}$)	w (menit)	N (pelat)	(cm/pelat)
1	Katekin	41,5800	0,8	20,474	1293587	1,9355	1790,3545	0,0140
	Epikatekin	40,1664		40,387	823094	2,9032	3096,3444	0,0081
2	Katekin	41,5800	1,0	16,552	969565	1,7647	1407,5997	0,0178
	Epikatekin	40,1664		32,469	715046	2,6471	2407,2274	0,0104
3	Katekin	41,5800	1,2	13,973	801313	1,4706	1444,4755	0,0173
	Epikatekin	40,1664		28,034	621182	2,0588	2966,6192	0,0084

Keterangan :

Kondisi optimum analisis menggunakan fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit, dengan detektor UV pada 280 nm.

Tabel 4.2
Data kurva kalibrasi dan linearitas katekin

Konsentrasi (ppm)	Area ($\mu\text{V/s}$)	$\Delta y/\Delta x$
(x)	(y)	
2,079	118015	21455,0265
4,158	162620	22417,0274
6,237	209225	23452,6215
8,316	257983	20979,3170
1,395	301599	18257,3353
12,474	339556	21760,4618
20,790	520516	21599,2785
41,580	969565	

Persamaan garis : $y = 21511x + 74781$

Koefisien korelasi : $r = 0,99995$

S_{xo} : 0,13250

V_{xo} : 0,01000

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 280 nm

Tabel 4.3
Data kurva kalibrasi dan linearitas epikatekin

Konsentrasi (ppm)	Area ($\mu\text{V/s}$)	
(x)	(y)	$\Delta y/\Delta x$
20,0832	397665	15803,3082
40,1664	715046	15316,8320
60,2496	1022657	17126,9519
80,3328	1366621	17667,4036
100,4160	1721439	14149,0898
120,4992	2005598	17215,2346
140,5824	2351335	14037,7032
160,6656	2633257	
Persamaan garis : $y = 16084x + 73083$		
Koefisien korelasi : $r = 0,99972$		
Sxo : 1,24513		
Vxo : 0,01378		

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 280 nm

Tabel 4.4
Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi katekin

Konsentrasi (ppm) (x)	Area ($\mu\text{V/s}$) (y)	Area dari regresi ($\mu\text{V/s}$) (y_i)	($y-y_i$) ²
2,079	118015	119502,369	2212266,542
4,158	162620	164223,738	2571975,573
6,237	209225	208945,107	78340,091
8,316	257983	253666,476	18632379,440
10,395	301599	298387,845	10311516,430
12,474	339556	343109,214	12625329,730
20,790	520516	521994,690	2186524,116
41,580	969565	969208,380	127177,824

$$S_{y/x} = 2850,2076$$

$$\text{LOD} = 0,3975 \text{ ppm}$$

$$\text{LOQ} = 1,3250 \text{ ppm}$$

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 280 nm

Tabel 4.5
Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi epikatekin

Konsentrasi (ppm) (x)	Area ($\mu\text{V/s}$) (y)	Area dari regresi ($\mu\text{V/s}$) (y_i)	($y-y_i$) ²
20,0832	397665	396101,1888	2445505,469
40,1664	715046	719119,3776	16592405,070
60,2496	1022657	1042137,5660	379492467,300
80,3328	1366621	1365155,7550	2146942,324
100,4160	1721439	1688173,9440	1106563951,000
120,4992	2005598	2011192,1330	31294321,780
140,5824	2351335	2334210,3220	293254610,300
160,6656	2633257	2657228,5100	574633310,900

$$S_{y/x} = 20026,7468$$

$$\text{LOD} = 3,7354 \text{ ppm}$$

$$\text{LOQ} = 12,4513 \text{ ppm}$$

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 280 nm

Tabel 4.6
Data hasil uji presisi katekin

Level	Sampel (mg)	Standar (mg)	Area (μ V/s)	Konsentrasi (ppm)	Kadar (μ g/mg)	Rata-rata (μ g/mg)	SD (μ g/mg)	KV (%)
50 %	201,2	0,396	1102530	47,7778	5,9366	5,9788	0,0432	0,7225
	201,5	0,396	1111048	48,1738	5,9769			
	201,9	0,396	1121104	48,6413	6,0229			
100 %	202,4	0,792	1306349	57,2529	7,0718	7,0430	0,0260	0,3687
	202,8	0,792	1299986	56,9571	7,0213			
	202,9	0,792	1303107	57,1022	7,0358			
150 %	201,8	1,188	1445336	63,7141	7,8932	7,9056	0,0186	0,2359
	202,7	1,188	1457353	64,2728	7,9271			
	201,9	1,188	1446601	63,7730	7,8966			

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μ l, fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 280 nm

Tabel 4.7
Data hasil uji presisi epikatekin

Level	Sampel (mg)	Standar (mg)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi (ppm)	Kadar ($\mu\text{g/mg}$)	Rata-rata ($\mu\text{g/mg}$)	SD ($\mu\text{g/mg}$)	KV (%)
50 %	201.2	0.768	1530863	90.6354	11.2619	11.4631	0.1775	1.5480
	201.5	0.768	1567810	92.9325	11.5301			
	201.9	0.768	1579498	93.6592	11.5972			
100 %	202.4	1.536	2014872	120.7280	14.9121	15.1492	0.2073	1.3685
	202.8	1.536	2061421	123.6221	15.2394			
	202.9	1.536	2069802	124.1432	15.2961			
150 %	201.8	2.304	2557050	154.4371	19.1325	19.0717	0.0757	0.3967
	202.7	2.304	2549152	153.9461	18.9869			
	201.9	2.304	2553504	154.2167	19.0957			

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 280 nm

Tabel 4.8
Data hasil uji perolehan kembali katekin

Level	Area	Kons.	Kadar	Standar	Kons.	Kadar	Area	Kons.	Kadar	Rata-	UPK	rata	SD	KV
	Sampel	Sampel	Sampel		Standar	Standar		Standar	Total					
	(mg)	($\mu\text{v/s}$)	(ppm)	(mg)	(ppm)	($\mu\text{g/mg}$)	($\mu\text{v/s}$)	(ppm)	($\mu\text{g/mg}$)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
50%	201,2	714158	29,7233	3,6932	0,396	15,84	1,9682	1102530	47,7778	5,9366	113,9809			
	201,5	718201	29,9112	3,7111	0,396	15,84	1,9653	1111048	48,1738	5,9769	115,2943	115,6351	1,8483	1,5984
	201,9	720298	30,0087	3,7158	0,396	15,84	1,9614	1121104	48,6413	6,0229	117,6301			
100%	202,4	729151	30,4203	3,7574	0,792	31,68	3,9130	1306349	57,2529	7,0718	84,6991			
	202,8	732018	30,5535	3,7665	0,792	31,68	3,9053	1299986	56,9571	7,0213	83,3447	83,5753	1,0281	1,2301
	202,9	739654	30,9085	3,8083	0,792	31,68	3,9034	1303107	57,1022	7,0358	82,6822			
150%	201,8	735682	30,7239	3,8062	1,188	47,52	5,8870	1445336	63,7141	7,8932	69,4240			
	202,7	742685	31,0494	3,8295	1,188	47,52	5,8609	1457353	64,2728	7,9271	69,9145	70,1304	0,8356	1,1914
	201,9	720298	30,0087	3,7158	1,188	47,52	5,8841	1446601	63,7730	7,8966	71,0527			

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 280 nm; Kons. = Konsentrasi

Tabel 4.9
Data hasil uji perolehan kembali epikatekin

Level	Sampel (mg)	Area Sampel ($\mu\text{v/s}$)	Kons. Sampel (ppm)	Kadar Sampel ($\mu\text{g/mg}$)	Standar (mg)	Kons. Standar (ppm)	Kadar Standar ($\mu\text{g/mg}$)	Area Total ($\mu\text{v/s}$)	Kons. Total (ppm)	Kadar Total ($\mu\text{g/mg}$)	UPK (%)	Rata-rata (%)	SD (%)	KV (%)
50%	201,2	1045698	60,4710	7,5138	0,768	30,72	3,8171	1530863	90,6354	11,2619	98,1916			
	201,5	1072625	62,1451	7,7103	0,768	30,72	3,8114	1567810	92,9325	11,5301	100,2195	99,9341	1,6189	1,6199
	201,9	1078523	62,5118	7,7404	0,768	30,72	3,8039	1579498	93,6592	11,5972	101,3913			
100%	202,4	1042332	60,2617	7,4434	1,536	61,44	7,5889	2014872	120,7280	14,9121	98,4152			
	202,8	1064851	61,6618	7,6013	1,536	61,44	7,5740	2061421	123,6221	15,2394	100,8469	100,1458	1,5077	1,5055
	202,9	1069987	61,9811	7,6369	1,536	61,44	7,5702	2069802	124,1432	15,2961	101,1753			
150%	201,8	1057842	61,2260	7,5850	2,304	92,16	11,4172	2557050	154,4371	19,1325	101,1406			
	202,7	1085664	62,9558	7,7647	2,304	92,16	11,3666	2549152	153,9461	18,9869	98,7308	99,7925	1,2301	1,2327
	201,9	1078523	62,5118	7,7404	2,304	92,16	11,4116	2553504	154,2167	19,0957	99,5061			

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 280 nm; Kons. = Konsentrasi

Tabel 4.10
 Hasil penetapan kadar katekin pada sampel

Sampel	Berat Sampel (mg)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Kadar katekin (ppm)	Kadar katekin ($\mu\text{g/mg}$)	Kadar Rata-rata ($\mu\text{g/mg}$)	SD ($\mu\text{g/mg}$)	KV (%)
Nib	204.0	362609	13.3805	1.6398	1.6060	0.0309	1.9254
	200.8	347614	12.6834	1.5791			
	202.4	353253	12.9456	1.5990			
Pasta	204.6	612772	25.0100	3.0560	3.0119	0.0557	1.8485
	201.8	586898	23.8072	2.9494			
	202.9	603856	24.5956	3.0305			
Bubuk	201.2	722201	30.0972	3.7397	3.7597	0.0622	1.6544
	202.7	742685	31.0494	3.8295			
	201.5	718018	29.9027	3.7100			

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 280 nm

Tabel 4.11
 Hasil penetapan kadar epikatekin pada sampel

Sampel	Berat Sampel (mg)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Kadar epikatekin (ppm)	Kadar epikatekin ($\mu\text{g/mg}$)	Kadar Rata-rata ($\mu\text{g/mg}$)	SD ($\mu\text{g/mg}$)	KV (%)
Nib	204,0	563984	30,5211	3,7403	3,7060	0,0696	1,8772
	200,8	541509	29,1237	3,6260			
	202,4	561624	30,3743	3,7518			
Pasta	204,6	971734	55,8724	6,8270	6,7099	0,1074	1,6012
	201,8	932029	53,4038	6,6159			
	202,9	945949	54,2692	6,6867			
Bubuk	201,2	1059622	61,3367	7,6214	7,6271	0,1347	1,7663
	202,7	1085664	62,9558	7,7647			
	201,5	1044764	60,4129	7,4954			

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak air-asetonitril-asam trifluoroasetat 4 % (90:10:1, v/v/v), laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 280 nm



Lampiran 1

Cara memperoleh persamaan regresi linier

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum y_i)(\sum x_i^2) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{N(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum x_i \cdot y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{N(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum x \cdot y) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{(N(\sum x^2) - (\sum x)^2)(N(\sum y^2) - (\sum y)^2)}}$$

Lampiran 2
Cara perhitungan uji presisi

Rata - rata :
$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Simpangan baku :
$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{*n - 1}}$$

n = jumlah data

*n-1 untuk data > 3

*n untuk data ≤ 3

Simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) :

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

Lampiran 3
Cara perhitungan uji perolehan kembali

$$\% \text{UPK} = \frac{\text{Kadar total} - \text{kadar zat dalam sampel}}{\text{Kadar standar yang ditambahkan}} \times 100 \%$$

Keterangan :

- Kadar total = kadar zat dalam campuran sampel dan standar
- Kadar zat dalam sampel = kadar zat dalam sampel tanpa ditambahkan standar
- Kadar total dan Kadar zat dalam sampel dinyatakan dalam satuan ($\mu\text{g}/\text{mg}$) sampel

$$\text{Kadar} = \frac{\text{Kadar dari kurva kalibrasi} \times \text{Faktor pengenceran}}{\text{Berat sampel yang ditimbang}}$$

Kadar dari kurva kalibrasi dinyatakan dalam satuan (ppm)

Faktor pengenceran dalam penelitian ini adalah (25 ml)

Berat sampel yang ditimbang dinyatakan dalam satuan (mg)

- Kadar standar yang ditambahkan ($\mu\text{g}/\text{mg}$) = berat standar (mg) yang ditimbang dan ditambahkan ke sampel dibagi berat sampel yang ditimbang (mg) dikalikan 1000

Lampiran 4

Cara perhitungan batas deteksi, batas kuantitasi dan linearitas

$$\text{Simpangan baku residual: } S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}}$$

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = \frac{3 S(y/x)}{b}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOQ)} = \frac{10 S(y/x)}{b}$$

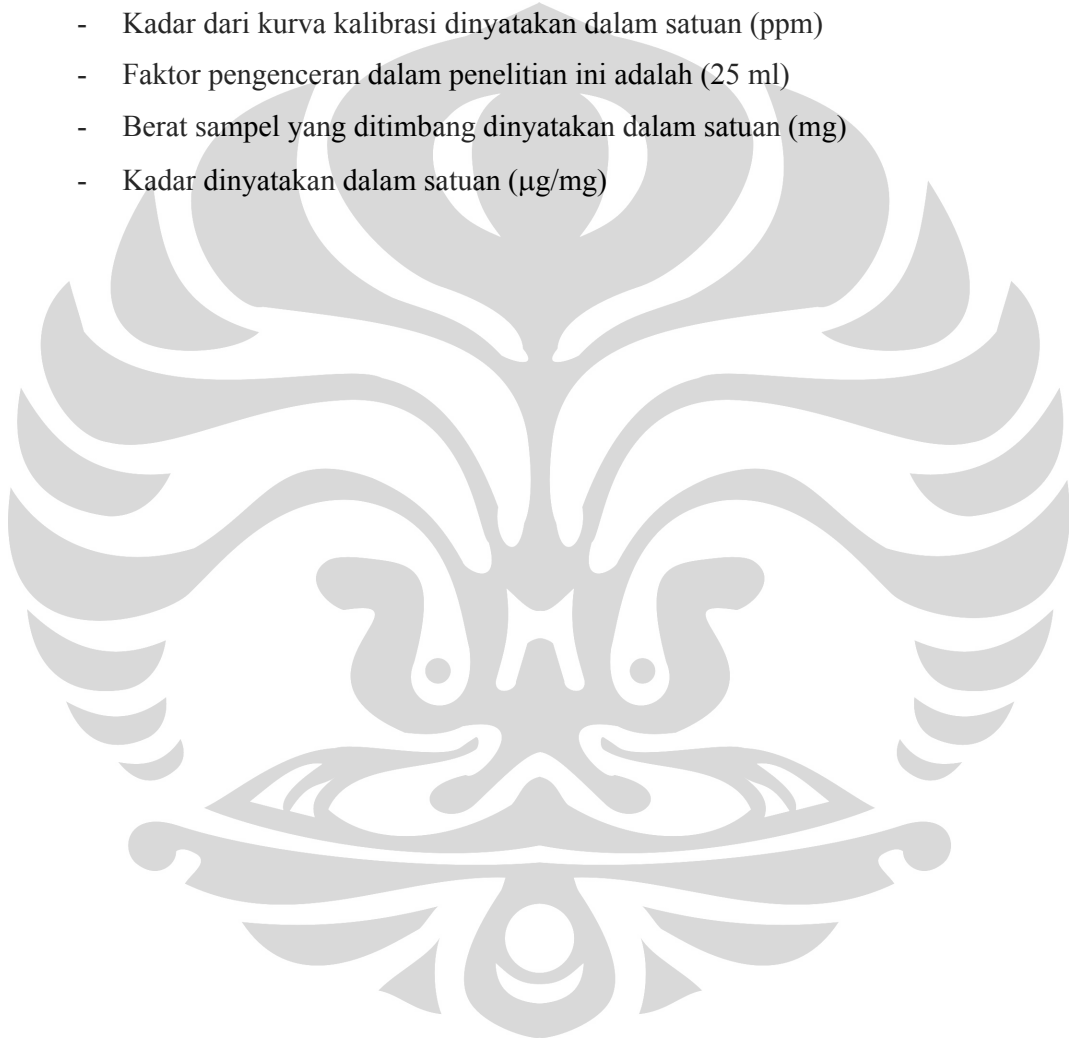
$$\text{Standar deviasi dari fungsi: } S_{x_0} = \frac{S(y/x)}{b}$$

$$\text{Koefisien variasi dari fungsi: } V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{x}$$

Lampiran 5
Cara perhitungan kadar zat dalam sampel

$$\text{Kadar} = \frac{\text{Kadar dari kurva kalibrasi} \times \text{Faktor pengenceran}}{\text{Berat sampel yang ditimbang}}$$

- Kadar dari kurva kalibrasi dinyatakan dalam satuan (ppm)
- Faktor pengenceran dalam penelitian ini adalah (25 ml)
- Berat sampel yang ditimbang dinyatakan dalam satuan (mg)
- Kadar dinyatakan dalam satuan ($\mu\text{g}/\text{mg}$)



Lampiran 6
Sertifikat analisis katekin



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name (+)-Catechin hydrate,
≥ 98% (TLC), powder
Product Number C1251
Product Brand Sigma-Aldrich
CAS Number 225937-10-0
Molecular Formula $C_{15}H_{14}O_6 \cdot xH_2O$
Molecular Weight 290.27 (anhydrous basis)

TEST	SPECIFICATION	LOT 096K1434 RESULTS
APPEARANCE	OFF-WHITE TO YELLOW POWDER WITH A GRAY TO TAN CAST	YELLOW POWDER WITH TAN CAST
SOLUBILITY	CLEAR TO SLIGHTLY HAZY YELLOW TO AMBER SOLUTION AT 50MG/ML IN ETHANOL	CLEAR AMBER
PROTON NMR SPECTRUM	CONSISTENT WITH STRUCTURE	CONFORMS
WATER CONTENT BY NMR	REPORT RESULT	2.3%
SPECIFIC ROTATION	REPORT RESULT	+24 DEG (C=1 IN WATER AT 20 DEG CELSIUS)
PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY	MINIMUM 98%	99%
RECOMMENDED RETEST	4 YEARS	JANUARY 2011
QC RELEASE DATE		JANUARY 2007

Rodney Burbach, Supervisor
Analytical Services
St. Louis, Missouri USA

Lampiran 7
Sertifikat analisis epikatekin



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name (-)-Epicatechin,
≥ 90% (HPLC)
Product Number E1753
Product Brand Sigma
CAS Number 490-46-0
Molecular Formula C₁₅H₁₄O₆
Molecular Weight 290.27

TEST	SPECIFICATION	LOT 026K2611 RESULTS
APPEARANCE	OFF-WHITE TO TAN POWDER	FAINT BEIGE POWDER
SOLUBILITY	CLEAR COLORLESS TO YELLOW SOLUTION AT 10MG/ML IN ACETONE:WATER (1:1)	CLEAR COLORLESS
IR SPECTRUM	CORRESPONDS	CONFORMS
SPECIFIC ROTATION	REPORT RESULT	-55.2 DEG (C = 1 IN ACETONE:WATER {1:1} AT 20 DEG C)
PURITY BY HPLC	MINIMUM 90%	96%
RECOMMENDED RETEST	2 YEARS	DECEMBER 2007
QC RELEASE DATE		FEBRUARY 2006

Rodney Burbach, Supervisor
Analytical Services
St. Louis, Missouri USA

Lampiran 8
Laporan hasil uji sampel biji kakao



DEPARTEMEN PERINDUSTRIAN R.I
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN INDUSTRI
BALAI BESAR INDUSTRI AGRO

LABORATORIUM ANALISIS DAN KALIBRASI BALAI BESAR INDUSTRI AGRO
ANALYTICAL AND CALIBRATION LABORATORIES
CENTER FOR AGRO-BASED INDUSTRY

Jalan Ir. H. Juanda 11, Bogor 16122 Telp. : (0251) 324068, 323339 Fax. : (0251) 323339

Kepada :

To Ir. Lukman Junaedi
BALAI BESAR INDUSTRI AGRO
Jl. Ir. H. Juanda No. 11
BOGOR

LAPORAN HASIL UJI
TEST REPORT

Isi surat/	Nomor / Number : 1017/LHU/Bd/ABICAL.1/II/2009
tanggal : -	Nomor Analisis : BB. 342 s.d. BB. 346
<i>of your letter/</i>	<i>Analysis Number</i>
<i>test dated</i>	Nomor Seri : 1017
	<i>Serial Number</i>
	Halaman : 1 dari / of 2
	Tanggal penerbitan : 6 Februari 2009
	<i>date of issue</i>

Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian
undersigned artis that the testing of

adalah : Bubuk Kakao / Coklat
of (s)

jenis analisis : Kimia
of analysis

deskripsi contoh : Dikemas dalam kantong plastik
of sample

asal dari : -
of from

: -

tanggal penerimaan contoh : 3 Desember 2008
of sample

tanggal pelaksanaan analisis : 9 Desember 2008
of analysis

jumlah pengambilan contoh : -
of sample

hasil sebagai berikut : -
of result to as follows

04a

HASIL PENGUJIAN INI TIDAK UNTUK DIGANDAKAN
DAN HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH
TERSEBUT DIATAS.
PENGAMBILAN CONTOH BERTANGGUNG JAWAB
ATAS KEBENARAN TANDING BARANG

Lanjutan

H A S I L TEST RESULT

Nomor Seri : 1017
Serial Number

Nomor / Number : 1017/LHU/Bd/ABICAL.1/ 1/2018

Nomor Analisis : BB. 342 s.d. BB. 346
Analysis Number

Halaman / Page : 2 Dari / of 2

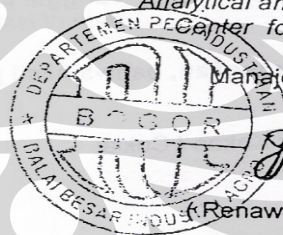
No. Analisis		BB. 342	BB. 343	BB. 344	BB. 345	BB.346	Metode Uji
Kode Contoh		A	B	C	D	E	
Parameter	Satuan	Hasil					SNI. 01-2891-1992, butir 8.2
Lemak	%	36,5	38,8	36,7	36,2	35,0	

**ASLI
ORIGINAL**

Laboratorium Analisis dan Kalibrasi
Balai Besar Industri Agro

Analytical and Calibration Laboratories
Center for Agro-Based Industry

Manajer Teknis Pengujian



(Renawati Iskandar, M. Phil)

HASIL PENGUJIAN INI TIDAK UNTUK DIGANDAKAN
DAN HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH
TERSEBUT DIATAS.
PENGAMBILAN CONTOH BERTANGGUNG JAWAB
ATAS KEBENARAN TANDING BARANG.