

**OPTIMASI METODE ANALISIS KATEKIN DAN EPIKATEKIN
DALAM BIJI KAKAO SERTA PRODUK OLAHANNYA
SECARA KROMATOGRAFI CAIR SPEKTROMETRI MASSA**

**SUBAGJA
0606002345**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
2009**



**OPTMIASI METODE ANALISIS KATEKIN DAN EPIKATEKIN
DALAM BIJI KAKAO SERTA PRODUK OLAHANNYA
SECARA KROMATOGRAFI CAIR SPEKTROMETRI MASSA**

**SUBAGJA
0606002345**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk
memperoleh gelar Magister Sains



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
2009**

LEMBAR PENGESAHAN

**JUDUL : OPTIMASI METODE ANALISIS KATEKIN DAN EPIKATEKIN
DALAM BIJI KAKAO SERTA PRODUK OLAHANNYA
SECARA KROMATOGRAFI CAIR SPEKTROMETRI MASSA**

Nama : Subagja

NPM : 0606002345

MENYETUJUI,

1. Komisi Pembimbing



Dr. Harmita
Pembimbing I



Dr. Herman Suryadi, MS
Pembimbing II

2. Penguji

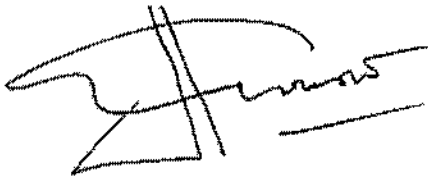


Dr. Abdul Mun'im, MS
Penguji I



Prof. Dr. Endang Hanani, MS
Penguji II

**3. Ketua Program
Pascasarjana Ilmu
Kefarmasian FMIPA-UI**



Prof. Dr. Effionora Anwar, MS
NIP. 130 536 769

**4. Ketua Program
Pascasarjana FMIPA - UI**



Dr. Adi Basukriadi, M.Sc.
NIP. 131 472 297

Tanggal Lulus : 7 Juli 2009

**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS
(Hasil Karya Perorangan)**


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

Nama : SUBAGJA
NPM/NIP : 0606002304
Program Studi : ILMU KEFARMASIAN
Fakultas : MIPA
Jenis karya : Skripsi/tugas akhir/tesis/disertasi/ laporan penelitian/ makalah

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Non- Eksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :
OPTIMASI METODE ANALISIS KATEKIN DAN EPIKATEKIN
DALAM BISI KAKAO SERTA PRODUK OLAHANNYA SECARA
KROMATOGRAFI CAIR SPEKTROMETRI MASSA

berserta perangkat yang ada (bila diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (*database*), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah ini menjadi tanggungjawab saya pribadi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : DEPOK
Pada tanggal : 2 JULI 2009
Yang menyatakan

(SUBAGJA)

Name : Subagja
Title : Optimization on Analytical Methods of Catechin and
Epicatechin in Cacao Bean and Cacao Products Using
Liquid Chromatography Mass Spectrometry
Thesis Supervisors : Dr. Harmita and Dr. Herman Suryadi, MS

SUMMARY

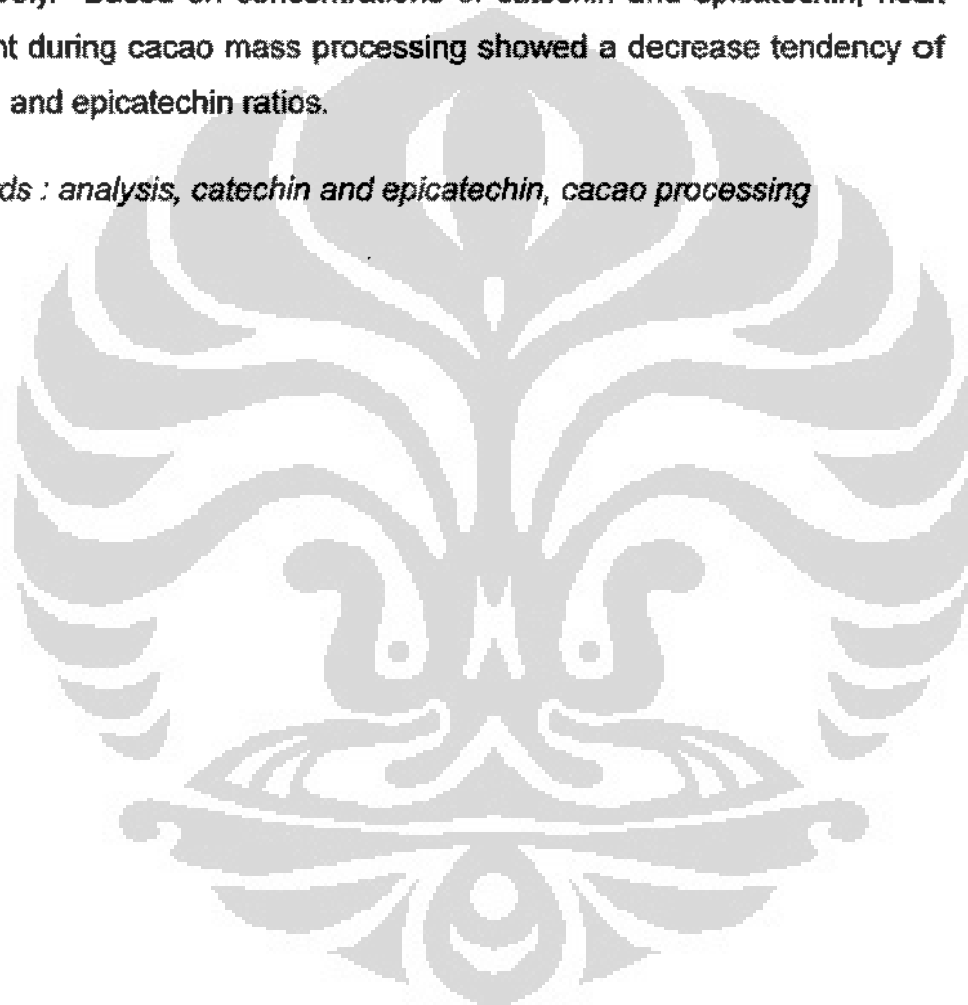
Cacao bean processing into its products may affect catechin and epicatechin contents in the final products. Temperature treatments during cacao processing can induce epimerization reaction of (-)-epicatechin to be (-)-catechin. The aims of this study were : (1) to obtain the valid analytical method which can be used to analyze catechin and epicatechin in cacao bean and cacao products by liquid chromatography mass spectrometry, and (2) to know the influence of temperature during processing of cacao beans, especially concentration of catechin and epicatechin.

Experiment was conducted in three steps, i.e.: optimization of analytical method, validation of selected method, and studying the influence of temperature to catechin and epicatechin concentration during cacao bean processing. Optimization of analytical method was carried out by varying solvents (acetonitrile and methanol) composition using gradient elution. Mobile phase flow rate was set at 0.5, 0.6, 0.8, and 1.0 ml/min. Catechin and epicatechin in cacao samples was detected by mass spectrometry. Condition of mass spectrometer was run by varying ESI voltage, nebulizer pressure, desolvation temperature, and desolvation gas. Validations test included some parameters such as specificity/ selectivity, linearity of calibration curve, limit of detection and limit of quantitation, precision and recovery test. Samples taken during the process were cacao nib, cacao mass, cacao powder and cacao butter.

The results of this study showed that analytical conditions for catechin and epicatechin were using mobile phase A (0.1 % formic acid in deionized water) and mobile phase B (acetonitril-methanol = 50:50) at flow

rate of 0.5 ml/min. Gradient elution were set at 0 minutes (10% B), 15 minutes (35% B), 20 minutes (40% B), 30 minutes (50% B), 35 minutes (60% B), and 35.1 minute (10% B). Mass spectrometer was set at ESI voltage (-) 3500 volt, desolvation temperature 300 °C, nebulizer pressure 50 psi, desolvation gas 10 L/min, and fragmentor voltage (-) 160 volt. Limit of detection and limit of quantitation of catechin were 0.28 and 0.93 ppm, respectively, while epicatechin were 7.15 and 23.84 ppm, respectively. Based on concentrations of catechin and epicatechin, heat treatment during cacao mass processing showed a decrease tendency of catechin and epicatechin ratios.

Key words : analysis, catechin and epicatechin, cacao processing



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas perkenan, ridha dan karuniaNya sehingga penelitian ini dapat berhasil dirancang dan diselesaikan. Topik yang dikaji dalam penelitian ini berjudul *Optimasi Metode Analisis Katekin dan Epikatekin dalam Biji Kakao Serta Produk Olahannya Secara Kromatografi Cair Spektrometri Massa*. Penelitian ini telah dilaksanakan mulai bulan Februari 2008 hingga Januari 2009.

Dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada beberapa pihak yang telah turut serta dalam penyelenggaraan penelitian ini :

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA-UI dan Ibu Prof. Dr. Effionora Anwar, MS, selaku Ketua Program Pascasarjana Ilmu Kefarmasian FMIPA-UI, atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menempuh pendidikan Strata 2 pada Program Studi Ilmu Kefarmasian di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
2. Bapak Dr. Harmita dan Bapak Dr. Herman Suryadi, selaku Komisi Pembimbing, atas bimbingan, masukan, dan arahan yang sangat berarti sejak penyusunan usulan hingga selesainya penelitian ini.
3. Bapak Ir. Yang Yang Setiawan, M.Sc., selaku Kepala Balai Besar Industri Agro, atas izin yang diberikan kepada penulis untuk menempuh pendidikan Strata 2 pada Program Studi Ilmu Kefarmasian di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Demikian pula atas izin penggunaan peralatan analisis yang ada di lingkungan BBIA.
4. Bapak Ir. W. Wahyu Wijayadi, M.M., selaku Kepala Bagian Tata Usaha, Balai Besar Industri Agro, atas dorongan semangat serta dukungannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

5. Seluruh rekan kerja di Balai Besar Industri Agro serta rekan-rekan kuliah pada Program Studi Ilmu Kefarmasian di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Angkatan 2006/2007, yang tidak mungkin disebutkan satu per satu atas segala dorongan semangat, dan dukungannya.
6. Istri tercinta, Ella Karlawati, atas dukungan, dorongan semangat, serta pengertiannya selama penelitian ini berlangsung.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih mempunyai kekurangan, untuk itu saran, masukan, maupun kritik yang konstruktif sangat diharapkan. Terakhir penulis berharap, betapapun kecilnya, penelitian ini dapat memberikan sumbangan yang berguna bagi perkembangan ilmu pengetahuan.



Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Klasifikasi Kakao	4
B. Tanaman Kakao di Indonesia	4
C. Senyawa Aktif yang Terdapat dalam Biji Kakao	6
D. Manfaat Kesehatan Biji Kakao	9
E. Pengolahan Kakao	12
F. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	17
G. Spektrometer Massa Waktu Lintas (<i>Time of Flight Mass Spectrometer = TOF MS</i>)	21
H. Validasi Metode Analisis	24
I. Metode Analisis Katekin dan Epikatekin	26

BAB III. BAHAN DAN METODE	30
A. Tempat dan Waktu	30
B. Alat	30
C. Bahan	30
D. Metode	31
E. Hipotesis	33
F. Cara Kerja	33
1. Pemilihan kondisi analisis katekin dan epikatekin	33
2. Validasi metode analisis katekin dan epikatekin	35
3. Analisis katekin dan epikatekin dalam sampel	37
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	38
A. Pemilihan kondisi analisis katekin dan epikatekin	38
B. Validasi metode analisis katekin dan epikatekin	47
C. Analisis katekin dan epikatekin dalam sampel	59
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	67
A. Kesimpulan	67
B. Saran	68
DAFTAR PUSTAKA	69

DAFTAR TABEL

Tabel	Uraian	Halaman
1	Perbedaan kakao mulia dan kakao lindak secara garis besar	6
2	Optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak	34
3	Optimasi terhadap kondisi spektrometer massa	35
4	Hasil percobaan optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak	42
5	Hasil percobaan optimasi terhadap kondisi spektrometer massa	44
6	Hasil percobaan optimasi terhadap perubahan laju alir fase gerak	46
7	Data untuk pembuatan kurva kalibrasi katekin	49
8	Kurva kalibrasi katekin pada berbagai rentang konsentrasi	50
9	Data untuk pembuatan kurva kalibrasi epikatekin	50
10	Data untuk perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi katekin	53
11	Data untuk perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi epikatekin	54
12	Batas deteksi katekin dan epikatekin yang dihitung berdasarkan larutan campuran kedua zat tersebut	55
13	Data uji presisi katekin dan epikatekin	56
14	Data uji perolehan kembali katekin dan epikatekin	58
15	Kadar katekin dan epikatekin dalam sampel kakao	61
16	Komposisi rata-rata biji kakao	63
17	Kadar katekin dan epikatekin dalam sampel kakao (data awal)	85

Tabel	Uraian	Halaman
18	Data uji presisi katekin	86
19	Data uji presisi epikatekin	86
20	Data uji perolehan kembali katekin	87
21	Data uji perolehan kembali epikatekin	87
22	Senyawa-senyawa yang terdapat dalam sampel kakao ..	88



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Uraian	Halaman
1	Senyawa polifenol utama yang terdapat dalam biji kakao	7
2	Senyawa polifenol lain yang terdapat dalam biji kakao	7
3	Senyawa polifenol non-flavan-3-ol yang terdapat dalam biji kakao	8
4	Struktur kimia klovamida dan dideoksi klovamida	8
5	Skema prinsip kerja Spektrometer Massa Waktu Lintas (<i>Time of Flight Mass Spectrometer = TOF-MS</i>)	23
6	Proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya	32
7	Kromatogram standar katekin dan standar epikatekin gabungan hasil ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom	40
8	Kurva kalibrasi katekin	49
9	Kurva kalibrasi epikatekin	51
10	Kurva kalibrasi epikatekin yang dibuat pada rentang konsentrasi 1 hingga 100 ppm	52
11	Tren kadar zat dalam sampel bubuk kakao, (a) katekin dan (b) epikatekin	64
12	Spektrum dari standar katekin	73
13	Spektrum dari standar epikatekin	73
14	Contoh kromatogram katekin dan epikatekin hasil optimasi terhadap komposisi fase gerak setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom	74

Gambar	U r a i a n	Halaman
15	Contoh kromatogram katekin dan epikatekin hasil optimasi terhadap kondisi spektrometer massa setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom	74
16	Contoh kromatogram katekin dan epikatekin hasil optimasi terhadap laju alir fase gerak setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom	75
17	Contoh kromatogram larutan metanol 30 % dalam air deionisasi sebelum dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom	75
18	Contoh kromatogram larutan metanol 30 % dalam air deionisasi setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom	76
19	Contoh kromatogram standar katekin pada konsentrasi 2 ppm setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom	76
20	Contoh kromatogram standar epikatekin pada konsentrasi 60 ppm setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom	77
21	Contoh kromatogram uji perolehan kembali pada level 25 persen, <i>non-spike</i> , setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom	77
22	Contoh kromatogram uji perolehan kembali pada level 25 persen, <i>spike</i> , setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom	78
23	Contoh kromatogram nib kakao	78
24	Contoh kromatogram pasta kakao	79

Gambar	Uraian	Halaman
25	Contoh kromatogram sampel bubuk kakao yang dipres pada suhu 40-50 °C	79
26	Contoh kromatogram sampel bubuk kakao yang dipres pada suhu 50-60 °C	80
27	Contoh kromatogram sampel bubuk kakao yang dipres pada suhu 60-70 °C	80
28	Contoh kromatogram sampel bubuk kakao yang dipres pada suhu 70-80 °C	81
29	Contoh kromatogram sampel bubuk kakao yang dipres pada suhu 80-90 °C	81
30	Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 40-50 °C	82
31	Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 50-60 °C	82
32	Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 60-70 °C	83
33	Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 70-80 °C	83
34	Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 80-90 °C	84
35	Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 40-50 °C, setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom	84

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tanaman cokelat atau kakao (*Theobroma cacao* L.) memang bukan tanaman asli Indonesia. Namun demikian, saat ini negara Indonesia merupakan penghasil biji kakao ketiga terbesar di dunia setelah Pantai Gading dan Ghana (Anonim, 2004).

Berbagai upaya telah dilakukan oleh pemerintah untuk meningkatkan produktivitas kakao Indonesia. Upaya tersebut adalah selain menambah luas lahan produksi juga melakukan peremajaan serta rehabilitasi tanaman kakao. Peremajaan tersebut perlu dilakukan mengingat bahwa tanaman kakao kita telah berumur rata-rata 15 tahun, padahal usia produktif tanaman ini adalah 6-12 tahun (Anonim, 2007b).

Peningkatan produktivitas kakao nasional baik melalui perluasan lahan produksi maupun melalui peremajaan dan rehabilitasi telah dilakukan sejak tahun 2006 hingga tahun 2010. Diharapkan pada tahun 2010 nanti, luas lahan kakao Indonesia mencapai 1,1 juta hektar. Bahkan untuk tahun 2020, pemerintah telah menargetkan luas lahan perkebunan kakao sebesar 1,4 juta hektar. Dengan luas lahan sebesar itu, diharapkan akan mampu menghasilkan kakao sebanyak 2 juta ton per tahun. Jika ini terlaksana, maka diharapkan Indonesia akan mampu menempati posisi pertama penghasil kakao dunia. Dengan demikian, Indonesia akan menggeser posisi Pantai Gading dan Ghana sebagai penghasil kakao nomor 1 dan 2 di dunia dengan kapasitas produksi setiap tahunnya masing-masing 1,5 dan 1 juta ton (Anonim, 2007b).

Zat-zat yang paling berperan dalam hal manfaat biji kakao bagi kesehatan adalah zat-zat yang tergolong kedalam kelompok polifenol. Diantara sekian banyak senyawa yang termasuk kedalam kelompok polifenol dan cukup luas sebarannya di alam (buah-buahan, sayur-mayur, teh, anggur merah dan kakao) adalah senyawa flavonoid. Khusus untuk

kakao, senyawa flavonoid yang banyak terdapat dalam biji kakao ini adalah katekin dan epikatekin, baik dalam bentuk monomer, dimer, trimer maupun oligomer (Keen *et al*, 2005; Roy, Lundy, dan Brantley, 2005). Menurut Wollgast (2004), 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. 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 (de Brito, Garcia, dan Amancio; 2002).

Pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya dapat mempengaruhi kandungan katekin dan epikatekin yang ada di dalamnya. Adanya perlakuan panas (pengaruh temperatur) selama 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 vivo*, adalah (-)-epikatekin.

Mengingat demikian banyaknya komponen kimia yang terdapat dalam biji kakao, sementara zat standar yang tersedia di pasaran selain jumlahnya terbatas juga mahal harganya, maka diperlukan suatu metode yang dapat memantau perubahan komposisi kimia yang terdapat dalam biji kakao beserta produk olahannya. Metode analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi yang dihubungkan dengan detektor spektrometer massa diharapkan mampu mengatasi keterbatasan-keterbatasan tersebut. Metode analisis ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode kromatografi biasa dalam hal

kemampuannya mengidentifikasi suatu senyawa berdasarkan rumus empiris dan bobot molekul ion (Anonim, 2005).

B. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah : (1) memperoleh metode analisis yang tervalidasi dan dapat digunakan untuk menganalisis senyawa katekin dan epikatekin yang terdapat dalam biji kakao beserta produk olahannya menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi yang dilengkapi dengan detektor spektrometer massa, dan (2) mengetahui pengaruh temperatur selama proses pengolahan terhadap perubahan komponen-komponen yang terkandung dalam biji kakao, khususnya katekin dan epikatekin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Klasifikasi Kakao

Kakao atau cokelat merupakan produk yang dihasilkan dari biji kakao. Tanaman penghasil biji kakao ini dalam bahasa Latin dikenal sebagai *Theobroma cacao* L. Klasifikasi tanaman kakao adalah sebagai berikut (Jones dan Luchsinger, 1987) :

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivisio : Spermatophyta
Divisio : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Sub-kelas : Dilleniidae
Ordo : Malvales
Familia : Sterculiaceae
Genus : *Theobroma*
Spesies : *Theobroma cacao* L.

B. Tanaman Kakao di Indonesia

Kakao merupakan salah satu komoditas perkebunan yang peranannya cukup penting bagi perekonomian nasional, khususnya sebagai penyedia lapangan kerja, sumber pendapatan dan devisa negara. Disamping itu, kakao juga berperan dalam 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 ketiga sub sektor perkebunan setelah karet dan kelapa sawit dengan nilai sebesar US \$ 701 juta (Anonim, 2008).

Perkebunan kakao Indonesia mengalami perkembangan pesat sejak awal tahun 1980-an. Pada tahun 2002, areal perkebunan kakao Indonesia tercatat seluas 914.051 hektar. Sebagian besar (87,4 %) areal perkebunan tersebut dikelola oleh rakyat dan selebihnya 6,0 % perkebunan besar negara serta 6,7 % perkebunan besar swasta (Anonim, 2008).

Menurut Spillane (1995) yang dikutip Rosniawaty, Ratnadewi dan Sudirja (2007), secara umum tanaman kakao dibagi dalam dua subspecies yaitu *Criolo* dan *Forastero*. *Criolo* merupakan tipe kakao pilihan (mulia) dan buahnya berwarna merah. Bijinya cenderung berbentuk bulat dan berwarna putih di bagian dalam serta menghasilkan kakao dengan rasa yang lembut dan istimewa, akan tetapi mudah terkena penyakit. *Forastero* merupakan tipe yang bermutu rendah (kakao lindak) dan buahnya berwarna hijau. Bijinya kecil dan tipis. Rasa *Forastero* lebih kuat dan digunakan dalam produksi coklat biasa dan coklat susu. Jenis kakao yang lain adalah *Trinitario*, yang merupakan hasil penyilangan dari jenis *Criolo* dan *Forastero*. Jenis *Trinitario* ada menghasilkan biji yang termasuk kakao mulia dan ada pula yang termasuk kakao lindak.

Jenis tanaman kakao yang dibudidayakan, sebagian besar adalah jenis kakao lindak (*bulk cacao*) dengan sentra produksi utama adalah Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara dan Sulawesi Tengah. Disamping itu, juga dibudidayakan jenis kakao mulia (*edel cacao*) oleh perkebunan besar negara di Jawa Timur dan Jawa Tengah (Anonim, 2008).

Kakao mulia dan kakao lindak bersifat komplementer (saling melengkapi). Kakao mulia berfungsi sebagai pencampur (*blending*) dan pelengkap dalam pembuatan hasil akhir industri kakao. Kakao lindak merupakan kakao yang mempunyai prospek untuk dikembangkan sebagai komoditas perkebunan rakyat. Kakao lindak mempunyai sifat cepat menghasilkan dan produktivitasnya tinggi. Secara garis besar perbedaan

dari kedua jenis kakao tersebut dapat dilihat pada Tabel 1 berikut (Sakdiyah, 2008):

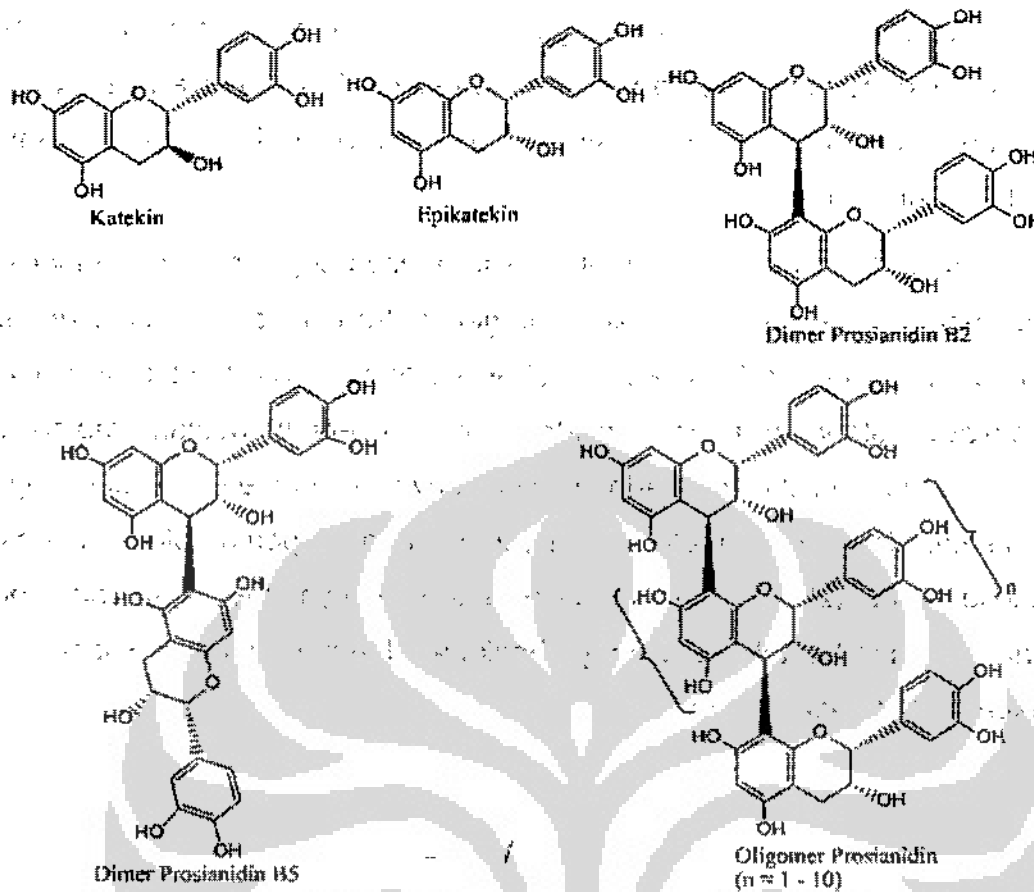
Tabel 1. Perbedaan kakao mulia dan kakao lindak secara garis besar

Komponen	Kakao mulia	Kakao lindak
Bentuk buah	Bulat telur – lonjong	Bulat – bulat telur
Warna buah muda	Merah	Hijau
Bentuk biji	Besar dan bulat	Kecil dan gepeng
Berat biji kering	> 1,2 gram	rata-rata 1 gram
Warna kotiledon	dominan putih	dominan ungu
Kandungan lemak biji	< 56 %	> 56 %
Aroma dan rasa	lebih baik	kurang
Ukuran dan berat biji	homogen	heterogen

C. Senyawa Aktif yang Terdapat dalam Biji Kakao

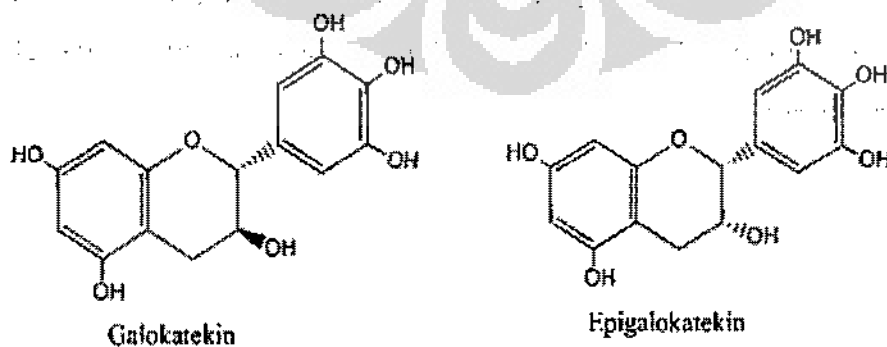
Tanaman kakao mengandung senyawa alkaloid yang dikenal dengan nama teobromin. Kandungan senyawa alkaloid ini dalam biji kakao sekitar 1 hingga 4 persen. Selain teobromin, biji kakao juga mengandung alkaloid kafein dalam jumlah kecil, yaitu sekitar 0,2 hingga 0,5 persen. Dibanding kafein, senyawa teobromin ini memiliki efek yang kurang kuat terhadap susunan saraf pusat. Senyawa teobromin lebih cenderung memiliki efek diuretik dan relaksan terhadap otot, meskipun penggunaannya secara rutin sudah ditinggalkan (Dewick, 1997).

Zat-zat yang paling berperan dalam hal manfaat biji kakao adalah zat-zat yang tergolong kedalam kelompok polifenol. Senyawa polifenol tersebut tersimpan dalam sel-sel pigmen kotiledon. Senyawa polifenol utama yang terdapat dalam biji kakao adalah katekin, epikatekin, dimer prosianidin B2, dimer prosianidin B5 dan bentuk oligomer prosianidin (Wollgast, 2004). Seluruh senyawa polifenol tersebut memiliki struktur inti flavan-3-ol yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Senyawa polifenol utama yang terdapat dalam biji kakao

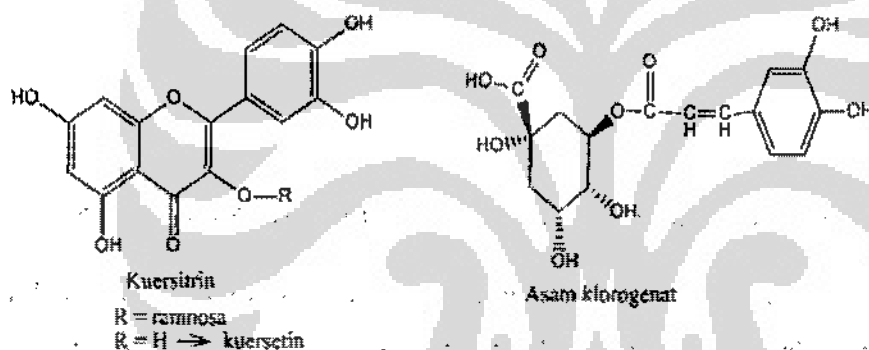
Selain itu, dalam biji kakao juga terdapat senyawa polifenol lain dalam jumlah sedikit. Senyawa polifenol tersebut adalah galokatekin dan epigalokatekin. Kedua senyawa tersebut banyak terdapat dalam tanaman teh (Wollgast, 2004). Seperti halnya dengan senyawa polifenol utama, galokatekin dan epigalokatekin juga memiliki struktur inti flavan-3-ol, dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Senyawa polifenol lain yang juga terdapat dalam biji kakao

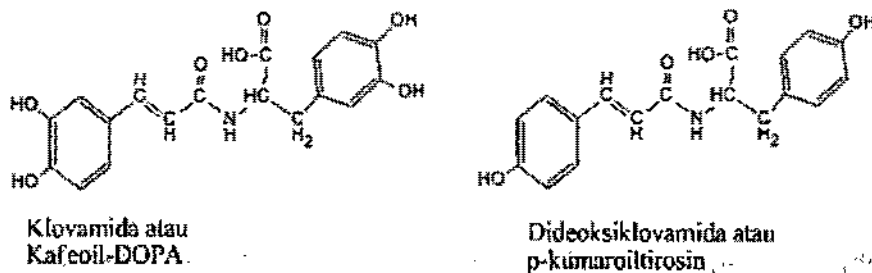
Selain dari kedua jenis senyawa polifenol di atas, dalam biji kakao juga mengandung senyawa polifenol non flavan-3-ol. Senyawa-senyawa tersebut ada yang memiliki struktur inti flavonoid dan turunan asam hidroksi sinamat.

Jalal dan Colin (1977) melaporkan adanya sejumlah kecil senyawa flavonoid (kuersetin) dan asam klorogenat (turunan dari asam hidroksi sinamat). Senyawa kuersetin tersebut biasanya dalam bentuk glikosida. Senyawa gula yang umum berikatan dengan kuersetin adalah arabinosa, glukosa dan galaktosa. Adakalanya senyawa kuersetin tersebut juga berikatan dengan asam glukuronat seperti yang dilaporkan oleh Andreas-Lacueva *et al* (2000). Namun senyawa kuersetin yang terdapat dalam biji kakao adalah bentuk glikosidanya berikatan dengan ramnosa (kuersitrin), dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Senyawa polifenol non-flavan-3-ol yang terdapat dalam biji kakao

Sanbongi *et al* (1998) telah melaporkan adanya senyawa lain yang juga terdapat dalam kakao. Senyawa tersebut merupakan bentuk amida dari suatu asam amino dengan asam hidroksi sinamat. Nama trivial senyawa tersebut adalah klovamide dan dideoksi klovamide, dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur kimia klovamida dan dideoksi klovamida

D. Manfaat Kesehatan Biji Kakao

Biji kakao memiliki manfaat yang tidak sedikit. Hal ini dibuktikan dengan cukup banyaknya tulisan yang dimuat dalam jurnal ilmiah yang menguraikan manfaat biji kakao bagi kesehatan. Manfaat kesehatan dari biji kakao dapat dikelompokkan ke dalam 4 (empat) kelompok, 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 (Wollgast, 2004).

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 adanya 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 *et al*, 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 reaktif yang diaktifkan leukosit, melindungi eritrosit dari hemolisis, dan menghambat oksidasi DNA (*Deoxyribose Nucleic Acid*) yang diinduksi sinar ultra violet 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 *et al*, 2005).

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).

Romanczyk *et al* (1997) telah menguji sifat antikarsinogenik ekstrak kakao menggunakan beberapa sel kanker manusia. Tampaknya hanya bentuk oligomer prosianidin, khususnya dengan 5 (lima) hingga 12 (dua belas) satuan monomer, yang menunjukkan efek antikarsinogenik tersebut. Diantara bentuk oligomer tersebut, ternyata bentuk oligomer dengan 5 (lima) satuan monomer (pentamer) memiliki efek yang 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 siklo oksigenase 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.

3. Manfaat yang berkaitan dengan kesehatan kardiovaskuler

Salah satu penyebab timbulnya masalah kesehatan kardiovaskuler adalah karena tidak-lancarnya aliran darah pada pembuluh kardiovaskuler. Ketidak-lancaran aliran darah tersebut dapat disebabkan oleh menyempitnya pembuluh darah 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 sebab itu, zat-zat yang memiliki sifat antioksidan (seperti flavonoid) dapat mencegah timbulnya plak-plak aterosklerotik. (Roy, Lundy, dan Brantley; 2005).

Selain melalui efek antioksidan, senyawa flavonoid yang terdapat dalam kakao juga dapat mempengaruhi kesehatan kardiovaskuler melalui mekanisme lain. Konsep aterogenesis 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 aterogenesis. 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* sebagaimana dilaporkan oleh Rein *et al* (2000). Beberapa indeks aktivasi platelet berkurang dalam rentang waktu 2 (dua) dan 6 (enam) 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 senyawa penanda biologis adanya trombogenesis.

Adanya penghambatan terhadap aktivasi platelet juga dilaporkan oleh Schramm *et al* (2001) namun 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 proses inflamasi adalah leukotrien dan prostasiklin. Leukotrien akan menstimulasi agregasi platelet sementara prostasiklin akan menghambat agregasi platelet. Leukotrien merupakan

vasokonstriktor dan proinflamatori sementara prostasiklin merupakan vasodilator dan antiinflamatori. Proses inflamasi terjadi bila kadar leukotrien lebih besar dibanding prostasiklin. Pemberian produk kakao ternyata dapat menyeimbangkan kadar prostasiklin dan leukotrien.

4. Manfaat yang berkaitan dengan respon imun dan antiinflamasi

Sanbongi *et al* (1998) telah melakukan penelitian efek polifenol yang terkandung dalam cairan kakao pada berbagai sel imun manusia dan fungsi-fungsinya secara *in vitro*. Hasil penelitian 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.

Menurut Romanczyk *et al* (1997), aktivitas anti-inflamasi 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.

E. Pengolahan Kakao

1. Pengolahan Buah Kakao

Proses pengolahan buah kakao menentukan mutu produk akhir kakao, karena dalam proses ini terjadi pembentukan calon citarasa khas

kakao dan pengurangan citarasa yang tidak dikehendaki, misalnya rasa pahit dan sepat. Tahap-tahap yang umum dilakukan dalam proses pengolahan buah kakao adalah (Anonim, 2007a):

a. Pemeraman buah

Pemeraman buah bertujuan untuk memperoleh keseragaman kematangan buah serta memudahkan pengeluaran biji dari buah kakao. Buah dimasukkan ke dalam keranjang rotan atau sejenisnya, disimpan di tempat yang bersih dengan alas daun-daunan dan permukaan tumpukannya ditutup pula dengan daun-daunan. Pemeraman dilakukan di tempat yang teduh. Lamanya pemeraman sekitar 5-7 hari (maksimum 7 hari).

b. Pemecahan buah

Pemecahan atau pembelahan buah kakao dimaksudkan untuk mendapatkan biji kakao. Pemecahan buah kakao harus dilakukan secara hati-hati agar tidak melukai atau merusak biji kakao. Pemecahan dilakukan menggunakan pemukul kayu atau memukulkan buah satu dengan buah lainnya. Harus dihindari kontak langsung dengan benda-benda logam, karena dapat menyebabkan warna biji kakao menjadi kelabu. Biji kakao dikeluarkan, lalu dimasukkan ke dalam ember plastik atau wadah lain yang bersih sedangkan empulur yang melekat pada biji dibuang.

c. Fermentasi

Fermentasi dimaksudkan untuk memudahkan melepas zat lendir dari permukaan kulit biji serta menghasilkan biji dengan mutu dan aroma yang baik. Selain itu, biji yang dihasilkan lebih tahan terhadap hama dan jamur selama penyimpanan serta menghasilkan biji dengan warna yang cerah dan bersih. Ada 2 (dua) cara fermentasi, yaitu: fermentasi menggunakan kotak/peti fermentasi dan fermentasi menggunakan keranjang bambu.

(1) Fermentasi menggunakan kotak/peti fermentasi

Biji kakao dimasukkan ke dalam kotak yang terbuat dari lembaran papan yang berukuran panjang 60 cm dengan tinggi 40 cm (kotak dapat menampung \pm 100 kg biji kakao basah). Setelah itu kotak ditutup dengan karung goni/daun pisang. Pada hari ke-3 (setelah 48 jam) dilakukan pembalikan agar fermentasi biji merata. Pada hari ke-6 biji-biji kakao dikeluarkan dari kotak fermentasi dan siap untuk dijemur.

(2) Fermentasi menggunakan keranjang bambu

Keranjang bambu yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dan dialasi dengan daun pisang baru. Kemudian biji kakao dimasukkan (keranjang dapat menampung \pm 50 kg biji kakao basah). Setelah itu tutup keranjang dengan daun pisang. Pada hari ke-3 (setelah 48 jam) dilakukan pembalikan agar fermentasi biji merata. Pada hari ke-6 biji-biji kakao dikeluarkan dari kotak fermentasi dan siap untuk dijemur.

d. Perendaman dan Pencucian

Tujuan perendaman dan pencucian adalah menghentikan proses fermentasi dan memperbaiki kenampakan biji. Sebelum pencucian, dilakukan perendaman \pm 3 jam agar biji memiliki kenampakan yang menarik dan berwarna coklat cerah. Pencucian dapat dilakukan secara manual (menggunakan tangan) atau menggunakan mesin pencuci. Pencucian yang terlalu bersih, hingga selaput lendirnya hilang sama sekali, selain menyebabkan kehilangan berat juga membuat kulit biji rapuh dan mudah terkelupas. Umumnya biji kakao yang dicuci adalah jenis edel sedangkan jenis lindak tergantung pada permintaan pasar.

e. Pengeringan

Pengeringan dapat dilakukan dengan cara menjemur, menggunakan mesin pengering atau kombinasi keduanya. Pada proses pengeringan terjadi sedikit fermentasi lanjutan dan penurunan kandungan air dari 55-60 persen menjadi 6-7 persen. Selain itu, terjadi pula

perubahan-perubahan kimia untuk menyempumakan pembentukan aroma dan warna yang baik.

Suhu pengeringan sebaiknya antara 55-60 °C dan lama pengeringan sekitar 20-25 jam jika menggunakan mesin pengering. Bila pengeringan dilakukan dengan cara menjemur di bawah sinar matahari maka lama pengeringan sekitar 7 hari bila cuaca baik dan sekitar 4 minggu bila banyak hujan. Biji yang kurang kering (kandungan air di atas 8 %) akan mudah ditumbuhi jamur.

f. Sortasi

Sortasi biji kakao kering dimaksudkan untuk memisahkan antara biji yang baik dengan biji yang cacat (biji pecah), kotoran atau benda asing lainnya (batu, kulit dan daun-daunan). Sortasi dilakukan setelah 1-2 hari pengeringan dengan maksud agar kandungan air dalam biji mencapai keseimbangan sehingga biji tidak terlalu rapuh dan tidak mudah rusak. Sortasi dilakukan menggunakan ayakan yang dapat memisahkan biji kakao dengan kotoran-kotoran.

g. Pengemasan dan Penyimpanan

Biji kakao dikemas dengan baik menggunakan wadah yang bersih dan kuat. Biasanya menggunakan karung goni dan tidak menggunakan karung plastik. Biji kakao disimpan dalam ruangan dengan kelembaban tidak melebihi 75%, berventilasi cukup dan bersih. Antara lantai dan wadah biji kakao diberi jarak ± 8 cm dan jarak dari dinding ± 60 cm. Biji kakao dapat disimpan hingga sekitar 3 bulan.

Jangan meletakkan biji kakao bersama-sama dengan produk pertanian lainnya yang berbau keras karena biji kakao dapat menyerap bau-bauan tersebut. Biji kakao juga jangan disimpan di atas para-para dapur karena dapat mengakibatkan biji kakao berbau asap.

2. Pengolahan Biji Kakao

Menurut Direktorat Industri Hasil Perkebunan dan Kehutanan (Anonim, 1994), proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya dilakukan melalui tahapan proses sebagai berikut :

- a. 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.
- b. Biji kakao yang telah bersih, disangrai pada suhu 100-130 °C hingga kadar air yang terkandung maksimum 5 persen. Pemanasan ini gunanya untuk memudahkan pemisahan kulit dan mengatur warna biji kakao. Setelah pemanasan, biji kakao yang sudah kering dipisahkan dari kulitnya dan dimasukkan ke dalam silo nib, sedang kulit dimasukkan ke dalam silo kulit.
- c. 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 penggiling kedua untuk menambah tingkat kehalusannya. Pasta kakao yang dihasilkan dapat langsung dijadikan bentuk batangan atau diproses lebih lanjut untuk menghasilkan lemak kakao (*cocoa butter*) dan bubuk kakao (*cocoa powder*).
- d. Pasta kakao dipisahkan dari lemaknya dengan cara pengepresan sehingga diperoleh hasil samping berupa lempengan kakao (bungkil kakao) yang masih mengandung kadar lemak sebesar 10 persen. Bungkil kakao kemudian digiling kembali hingga diperoleh kakao bubuk. Kakao bubuk ini kemudian diayak menggunakan ayakan ukuran mesh 200 untuk mendapatkan bentuk yang lebih halus. Kakao bubuk yang telah dihaluskan ini telah siap untuk digunakan sebagai bahan baku lanjutan untuk berbagai produk kakao olahan. Sementara itu, lemak

kakao yang diperoleh dimasukkan ke dalam plastik dan didinginkan, atau dimasukkan ke dalam kotak kemasan dan siap untuk dipasarkan.

F. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

1. Teori

Kemajuan dalam bidang teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang relatif sensitif telah menyebabkan perubahan kromatografi kolom cair menjadi suatu sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi. Metode ini dikenal sebagai kromatografi kinerja tinggi (KCKT) (Skoog dan Leavy, 1992).

KCKT memiliki banyak kelebihan dibanding metode analisis lainnya. Kelebihan tersebut diantaranya adalah (Johnson dan Stevenson, 1991):

- a. Waktu analisis relatif cepat.
- b. Daya pisahnya cukup baik.
- c. Peka.
- d. Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi.
- e. Kolom dapat dipakai kembali.
- f. Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil.
- g. Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah.

2. Komponen-komponen KCKT

Komponen-komponen penting dari KCKT adalah pompa, injektor, kolom dan detektor.

a. Pompa

Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen ke dalam kolom. Jenis-jenis yang digunakan antara lain pompa tekanan tetap, dan pompa semprit (Johnson dan Stevenson, 1991).

b. Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan sampel ke dalam kolom. Jenis-jenis injektor antara lain aliran henti, septum, katup jalan kitar, dan autoinjektor (Johnson dan Stevenson, 1991; Skoog dan Leavy, 1992).

c. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom merupakan bagian penting dalam KCKT, karena kolom ikut menentukan keberhasilan analisis. Kolom dapat dibagi menjadi 2 (dua) kelompok, yaitu kolom analitik (diameter dalam 2-6 mm) dan kolom preparatif (diameter dalam 6 mm atau lebih) (Johnson dan Stevenson, 1991; Skoog dan Leavy, 1992).

d. Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada di dalam eluat dan mengukur jumlahnya. Jenis-jenis detektor yang dapat digunakan antara lain detektor serapan optik, detektor indeks bias, detektor fluoresensi, detektor elektrokimia, detektor ionisasi nyala, dan detektor radioaktif.

Khusus untuk pemakaian detektor UV-Vis, pemilihan fase gerak dan pelarut juga perlu memperhatikan panjang gelombang penggal UV (*UV-cut off*) (Johnson dan Stevenson, 1991; Skoog dan Leavy, 1992).

3. Fase Gerak

Dalam KCKT, fase gerak adalah salah satu dari variabel yang mempengaruhi pemisahan. Variasi fase gerak pada KCKT sangat beragam dalam hal kepolaran dan selektivitasnya terhadap komponen dalam sampel.

Fase gerak yang baik harus mempunyai sifat-sifat sebagai berikut (Johnson dan Stevenson, 1991):

- a. Murni.
- b. Tidak bereaksi dengan kolom.
- c. Sesuai dengan detektor.
- d. Dapat melarutkan sampel.
- e. Selektif terhadap komponen.
- f. Viskositasnya rendah.
- g. Memungkinkan dengan mudah untuk memperoleh sampel kembali bila diperlukan.
- h. Harganya wajar.
- i. Dapat memisahkan dengan baik.

Pada kromatografi partisi digunakan fase gerak dan fase diam dengan polaritas yang berbeda. Jika fase gerak bersifat polar dan fase diam non-polar, dikenal sebagai kromatografi fase terbalik. Modifikasi pelarut fase gerak yang polar dengan pelarut yang kurang polar menyebabkan berkurangnya afinitas serta retensi pada kolom (Anonim, 1995).

4. Analisis Kuantitatif dengan KCKT

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncak kromatogramnya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu :

a. Metode Baku Luar (*External Standard Method*)

Larutan baku pembanding 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 (Johnson dan Stevenson, 1991).

b. Metode Baku Dalam (Internal Standard Method)

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 konsentrasi 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 (Johnson dan Stevenson, 1991).

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, dan resolusi.

a. 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)

b. Jumlah lempeng teoritis (N)

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

t = waktu retensi zat

W = lebar alas puncak

c. Nilai HETP (H)

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

L = panjang kolom

N = jumlah lempeng teoritis

d. Faktor kapasitas (k')

$$k' = \frac{t}{t_0} - 1$$

t = waktu retensi zat

t₀ = waktu retensi fase gerak

e. Resolusi (R)

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

N = jumlah lempeng teoritis

k' = faktor kapasitas

α = retensi relatif

G. Spektrometer Massa Waktu Lintas (*Time of Flight Mass Spectrometer = TOF MS*)

Spektrometer massa waktu lintas (*Time of Flight Mass Spectrometer = TOF MS*) telah dikembangkan pada tahun 1940-an, namun hingga tahun 1980-an popularitasnya masih terbatas. Peningkatan terbaru dalam teknologi waktu lintas (*time of flight*), mencakup akselerasi orthogonal, pemantul ion (*reflectrons*), dan elektronika kecepatan tinggi, secara nyata turut meningkatkan resolusi alat ini. Peningkatan resolusi, dikombinasikan dengan kuat dan mudahnya untuk menggunakan sumber ion *electrospray* (ESI) dan MALDI, menyebabkan alat ini merupakan suatu teknologi inti untuk analisis molekul besar dan kecil (Fjeldsted, 2003).

c. Nilai HETP (H)

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

L = panjang kolom

N = jumlah lempeng teoritis

d. Faktor kapasitas (k')

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

t = waktu retensi zat

t_a = waktu retensi fase gerak

e. Resolusi (R)

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

N = jumlah lempeng teoritis

k' = faktor kapasitas

α = retensi relatif

G. Spektrometer Massa Waktu Lintas (*Time of Flight Mass Spectrometer = TOF MS*)

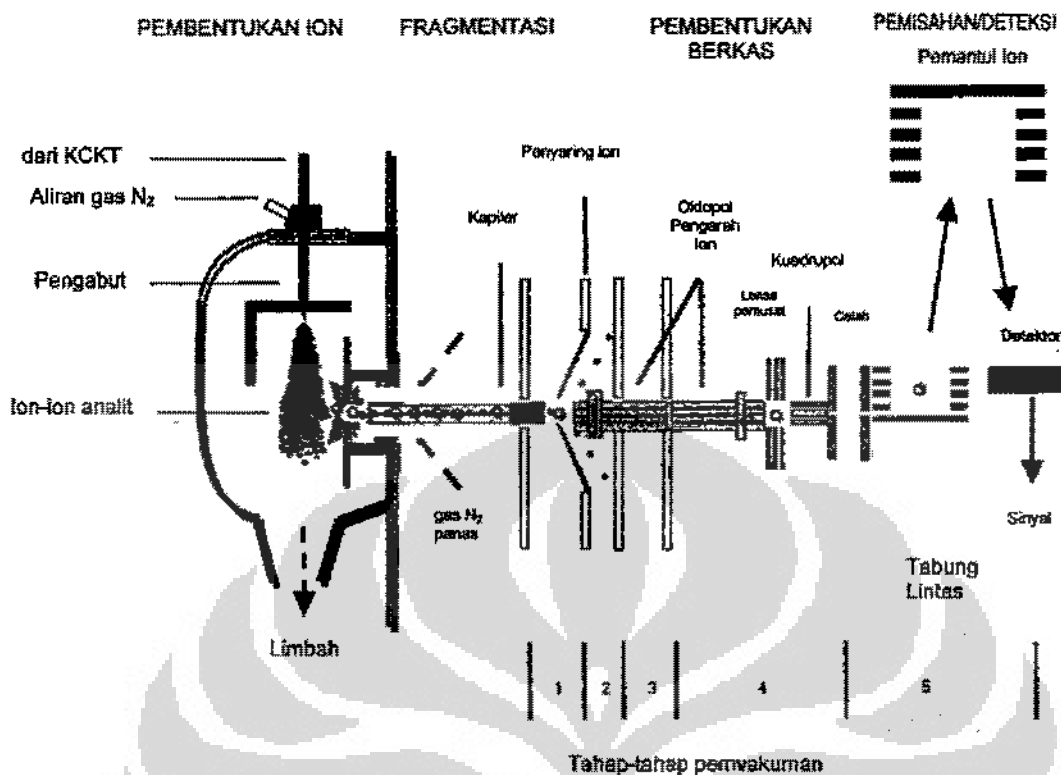
Spektrometer massa waktu lintas (*Time of Flight Mass Spectrometer = TOF MS*) telah dikembangkan pada tahun 1940-an, namun hingga tahun 1980-an popularitasnya masih terbatas. Peningkatan terbaru dalam teknologi waktu lintas (*time of flight*), mencakup akselerasi orthogonal, pemantul ion (*reflectrons*), dan elektronika kecepatan tinggi, secara nyata turut meningkatkan resolusi alat ini. Peningkatan resolusi, dikombinasikan dengan kuat dan mudahnya untuk menggunakan sumber ion *electrospray* (ESI) dan MALDI, menyebabkan alat ini merupakan suatu teknologi inti untuk analisis molekul besar dan kecil (Fjeldsted, 2003).

Spektrometer massa waktu lintas dapat dihubungkan dengan berbagai sumber ion. Dalam bahasan ini, dibatasi pada proses ionisasi yang terjadi pada tekanan atmosfer (*Atmospheric Pressure Ionization* = API) sebagai sumber ion. Menurut Fjeldsted (2003), ada beberapa tipe API, yaitu :

- *Electrospray ionization* (ESI) pada berbagai laju alir.
- *Atmospheric pressure chemical ionization* (APCI).
- *Atmospheric pressure photoionization* (APPI).
- *Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption ionization* (AP-MALDI).

Ion-ion dari sumber ion ini sampai ke dalam sistem vakum (ada 5 tahap sistem vakum) spektrometer massa melalui suatu alat penghubung. Secara skematis prinsip kerja alat ini dapat dilihat pada Gambar 5. Ion-ion yang dihasilkan sumber ion secara elektrostatis akan ditarik untuk memasuki pipa kapiler melewati aliran gas nitrogen kering dan panas untuk mencapai sistem vakum tahap pertama. Di ujung pipa kapiler terdapat penyaring ion (*skimmer*) yang memiliki lubang kecil. Hanya ion-ion yang memiliki massa dan momentum cukup besar saja yang dapat melewati penyaring ion tersebut. Sebagian besar molekul gas nitrogen tersedot oleh pompa vakum (Fjeldsted, 2003).

Ion-ion yang telah melewati penyaring ion selanjutnya memasuki sistem vakum tahap kedua dan ketiga yang merupakan pengarah ion oktopol pertama dari dua oktopol. Oktopol terdiri atas batang logam kecil yang diletakkan di sepanjang sumbu lintasan ion. Penggunaan tegangan frekwensi radio pada batang logam tersebut menghasilkan medan elektromagnetik yang akan membatasi ion-ion dengan nilai m/z tertentu saja yang tetap berada di sepanjang sumbu lintasan. Tekanan vakum disini sedemikian rendahnya sehingga hanya terdapat sedikit tumbukan antara ion dengan molekul gas (Fjeldsted, 2003).



Gambar 5. Skema prinsip kerja Spektrometer Massa Waktu Lintas (*Time of Flight Mass Spectrometer = TOF-MS*)

Ion-ion yang berada dalam oktopol pertama selanjutnya akan memasuki oktopol kedua yang merupakan sistem vakum tahap keempat. Pada oktopol kedua digunakan tegangan arus searah yang lebih rendah dibanding oktopol pertama. Disini terjadi penambahan kecepatan ion. Pada oktopol kedua digunakan penguat daya frekwensi radio yang beroperasi pada frekwensi 5 MHz. Penggunaan frekwensi sebesar ini memungkinkan analisis senyawa dengan rentang massa ion cukup lebar (lebih dari m/z 100 hingga m/z 3000) (Fjeldsted, 2003).

Dalam sistem vakum tahap keempat ini, ion-ion akan diubah menjadi seberkas ion yang sejajar oleh sistem optik yang ada. Selanjutnya ion-ion yang telah diubah menjadi seberkas ion yang sejajar tadi akan memasuki sistem vakum tahap kelima yang merupakan tahap terakhir. Disini ion-ion akan memasuki penganalisis massa waktu lintas. Ion-ion yang memiliki m/z lebih rendah akan lebih cepat mencapai detektor (Fjeldsted, 2003).

H. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter-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 (Harnita, 2006).

Beberapa parameter yang harus diuji dalam validasi metode analisis, antara lain : selektivitas (spesifisitas), 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*) (Harnita, 2006).

1. Selektivitas (*spesifisitas*)

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

2. Kecermatan (*akurasi*)

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

3. 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.

4. Linieritas dan rentang

Linieritas 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 linieritas yang dapat diterima.

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.

$$Q_{d,k} = \frac{k \times S_b}{SI}$$

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 blanko

SI = arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi, atau sama dengan slope (b pada persamaan garis $y = a + bX$)

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

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

6. Ketangguhan metode (*ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari hasil analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dan lain-lain. 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.

7. Kekuatan (*robustness*)

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

I. Metode Analisis Katekin dan Epikatekin

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

1. Penapisan secara cepat senyawa-senyawa flavonoid dalam kakao menggunakan KCKT dengan detektor spektrometer massa waktu lintas (Anonim, 2006).

Kondisi analisis :

KCKT : Agilent 1100

Kolom :	Ultra Aqueous C18 (Restek); 2,1 mm ID x 100 mm (3 μ m)
Laju alir :	400 μ L/menit
Waktu operasi :	15 menit
Fase gerak A :	0,1% asam format dalam air deionisasi
Fase gerak B :	Asetonitril : Metanol (50 : 50)
Gradien :	0 menit, 10% B; 10 menit, 60% B; 15 menit 60% B
Suhu kolom :	30 $^{\circ}$ C
Suhu <i>autosampler</i> :	10 $^{\circ}$ C
Volume injeksi :	5,0 μ l

Spektrometer Massa : LECO Unique® LC-TOFMS

- Tegangan ionisasi : (-) 3500 V
- Suhu gas pengering : 300 °C
- Tekanan pengabut : 375 kPa
- Laju alir gas pengering : 7 L/menit
- Suhu antarmuka : 100 °C
- Tegangan fragmentasi : (-) 160 V
- Laju akuisasi data : 4 spektrum/detik
- Kalibrasi massa : m/z = 112,9855; 431,9827; 601,9789; dan 1033,9882

2. Penetapan kadar katekin dan asam galat dalam teh hijau secara KCKT (Anonim, 2001).

Kondisi analisis I :

- Kolom : MetaChem Polaris TM Amide C18; 4,6 mm ID x 250 mm (5 µm)
- Laju alir : 1 mL/menit
- Fase gerak A : 0,1% asam fosfat
- Fase gerak B : Asetonitril
- Gradien : 0-12 menit (15-25 %B); 12-20 menit (25 %B, isokratik); 20-22 menit (25-15 %B); 22-30 menit (15 %B, isokratik).
- Detektor : UV, panjang gelombang 280 nm
- Volume injeksi : 10 µl

Kondisi analisis II :

- Kolom : Waters Symmetry Shield™ RP18; 4,6 mm ID x 250 mm (5 µm)
- Laju alir : 1 mL/menit
- Fase gerak A : 0,1% asam fosfat
- Fase gerak B : Asetonitril
- Gradien : 0-35 menit (8,0-78,0 %B); 35-36 menit (78 % B, isokratik); 36-40 menit (78,0-8,0 %B).
- Detektor : UV, panjang gelombang 280 nm
- Volume injeksi : 10 µl

3. Analisis senyawa polifenol utama dalam kakao dan keterkaitannya dengan kadarnya dalam cokelat secara kromatografi cair kinerja ultra fase balik dengan cepat (Cooper *et al*, 2007).

Kondisi analisis :

KCKT : Waters

Kolom : Acquity UPLC BEH C18; 2,1 mm ID x 50 mm (1,7 μm)
 Laju alir : 0,3 mL/menit
 Fase gerak A : Air/THF/TFA (92:2:0,1)
 Fase gerak B : 0,1 % TFA dalam Asetonitrit
 Gradien : 0,0-0,8 menit, 90-87% A (non linear); 5,0-8,1 menit, 0-90% A; 3,0-3,1 menit, 85-0% A; 3,1-5,0 menit, 0% A (linear); 5,0-5,1 menit, 0-90% A; 5,1-8,0 menit, 90% A.
 Detektor : UV, panjang gelombang 220 nm
 Volume injeksi : 5 μl

Spektrometer Massa : Micromass Q-TOF

- Laju gas pengering : 900 L/jam (maks.); 250 L/jam (auxiliary); 75 L/jam (cone)
 - Suhu pengabut : 400 °C
 - Suhu sumber ion : 150 °C
 - Tegangan waktu lintas : 9,1 kV
 - Tegangan pipa pancar : (-) 3 kV
 - Tegangan kerucut : (-) 20 V
 - Tegangan MCP : 2200 V
 - Rentang massa : 50 – 1500 Da
 - Waktu penyusuran : 0,2 detik
 - Energi tumbukan : 20 – 50 eV

4. Deteksi senyawa penanda kiral dalam biji kakao dengan mutu dan asal geografik yang berbeda secara kromatografi gas spektrometer massa (Caligiani *et al*, 2007).

Kondisi analisis :

KG : Agilent 6890 N

Kolom : Kolom kapiler DB-5; 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μm
 Suhu oven : 60 °C selama 3 menit kemudian ditingkatkan menjadi 280 °C dengan laju 20 °C per menit
 Suhu injektor dan detektor : 280 °C

Gas pembawa : Helium
 Volume injeksi : 1,0 μ l

Spektrometer Massa : Agilent 5973

Suhu sumber ion : 240 °C
 Energi ionisasi : 70 eV
 Akuisisi : Penyusuran penuh m/z 40 – 550

5. Perbandingan metode ekstraksi senyawa fenolat terpilih dari kulit buah anggur secara kromatografi cair dan spektrofotometri (Rusjan dan Korosec-Koruza, 2007).

Kondisi analisis :

KCKT : Thermo Finnigan

Kolom : 4 U MAX-RP 80 A; 4,6 mm ID x 250 mm
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Fase gerak A : 0,01 M asam fosfat
 Fase gerak B : Metanol
 Gradien : 5-50 % B (10 menit); 50-70 % B (5 menit); 70-80 % B (5 menit); 80-100 % B (5 menit)
 Detektor : UV, panjang gelombang 280 nm
 Volume injeksi : 20 μ l

6. (-)-Katekin dalam kakao dan cokelat : terdapatnya dan analisis enansiomer flavan-3-ol tipe A (Kofink, Papagiannopoulos, dan Galensa; 2007).

Kondisi analisis :

KCKT : Dionex

Kolom : Aqua C18; 2 mm ID x 150 mm (3 μ m)
 Laju alir : 0,3 mL/menit
 Fase gerak A : 1 % asam asetat dalam air
 Fase gerak B : 1 % asam asetat dalam Asetonitril
 Gradien : 0-60 % B (60 menit); 100 % B (10 menit); 0 % B (10 menit)
 Detektor : UV-Vis, panjang gelombang 200-595 nm
 Volume injeksi : 5 μ l

BAB III BAHAN DAN METODE

A. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Balai Besar Industri Agro, Jl. Ir. H. Juanda No. 11, Bogor. Penelitian berlangsung mulai bulan Januari 2008 hingga Januari 2009.

B. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi :

1. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi merk Agilent Seri 1200 yang dilengkapi dengan kolom Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 μ m, 80Å) dan alat Spektrometer Massa Waktu Lintas (*Time of Flight Mass Spectrophotometer*), merk Agilent Seri 6210.
2. Seperangkat alat untuk mengolah biji kakao : lemari pengering/oven (Mimmert), mesin penggiling (lokal), pengempa hidrolis (lokal).
3. Seperangkat alat untuk analisis katekin dan epikatekin dalam biji kakao beserta produk olahannya : neraca analitik (Ohaus), *ultrasonic bath* (Branson), alat sentrifugasi (Hettich).
4. Seperangkat alat untuk preparasi sampel : gelas piala, Erlenmeyer, labu ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi.

C. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi :

1. Bahan standar (+)-katekin (Sigma-Aldrich, C1251), (-)-epikatekin (Sigma-Aldrich, E1753), larutan ES-TOF Tuning Mix G1969-85000 dan API-TOF Reference Mass Solution Kit G1969-85001.
2. Biji kakao diperoleh dari perkebunan kakao, Jember, Jawa Timur (eks Proyek Penelitian dan Pengembangan BBIA).

3. Bahan kimia untuk fase gerak seperti asetonitril (Merck), metanol (Merck), air deionisasi, asam format (Merck) dengan kualifikasi *HPLC grade*.
4. Bahan kimia untuk preparasi sampel seperti heksana (Merck), metanol (Merck), air dengan kualifikasi pro analisis.
5. Larutan metanol 30 % : dibuat dengan cara melarutkan 300 ml larutan metanol *HPLC grade* dalam air deionisasi, kemudian ditepatkan hingga 1 liter.
6. Larutan asam format 0,1 % : dibuat dengan cara melarutkan 1 ml larutan asam format *HPLC grade* dalam air deionisasi, kemudian ditepatkan hingga 1 liter.

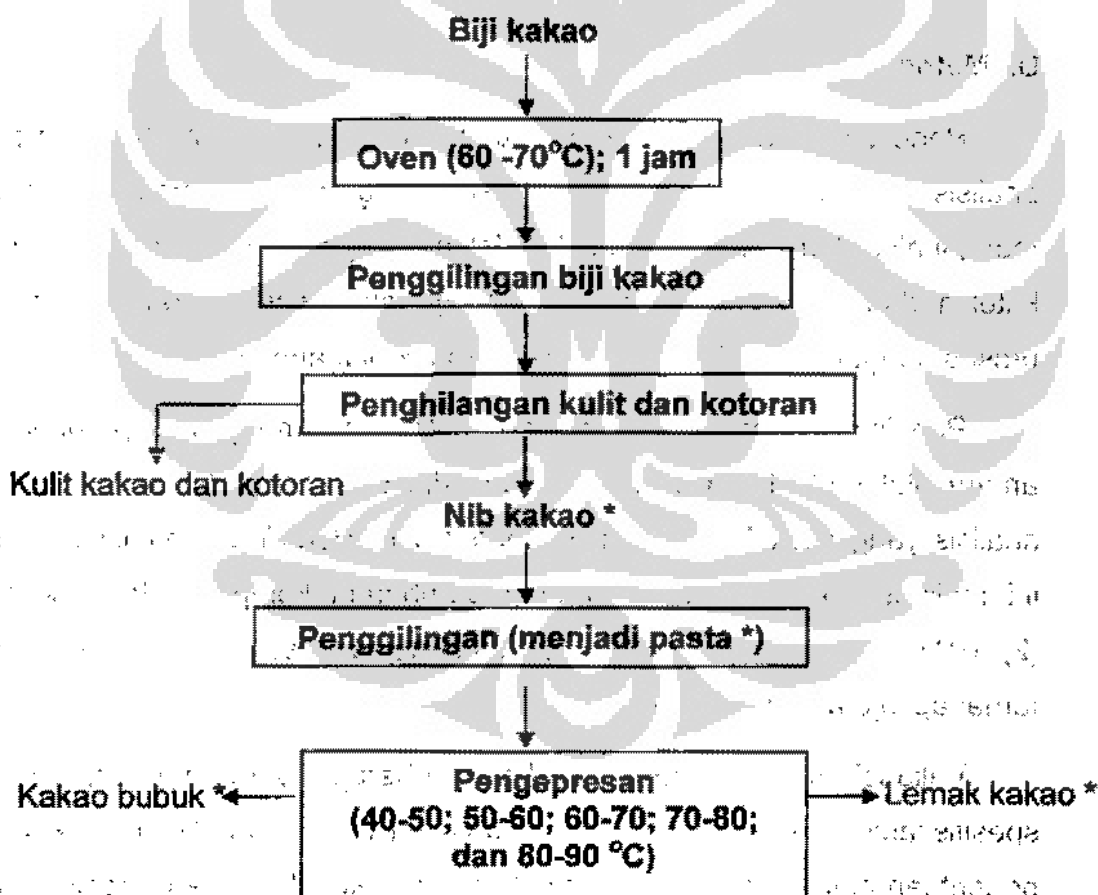
D. Metode

Penelitian dilakukan 3 (tiga) tahap, yaitu : (1) pemilihan kondisi analisis, (2) validasi metode analisis yang akan digunakan untuk menganalisis katekin dan epikatekin dalam sampel kakao, dan (3) analisis katekin dan epikatekin yang terkandung dalam sampel kakao selama proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya.

Pemilihan kondisi analisis perlu dilakukan mengingat perbedaan antara alat serta kondisi analisis yang diacu dengan alat serta kondisi analisis yang dilakukan dalam percobaan ini. Pemilihan kondisi analisis ini meliputi : (1) optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak, (2) optimasi terhadap kondisi spektrometer massa, dan (3) optimasi terhadap laju alir fase gerak.

Validasi metode analisis meliputi beberapa parameter seperti uji spesifisitas/selektifitas, pembuatan kurva kalibrasi serta linieritas kurva, penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi, keseksamaan (presisi) dan uji perolehan kembali. Setelah didapatkan metode analisis yang valid, berikutnya adalah menganalisis kadar katekin dan epikatekin dalam sampel kakao.

Analisis katekin dan epikatekin dalam sampel kakao dimaksudkan untuk mempelajari pengaruh temperatur selama proses pengolahan biji kakao menjadi produk-produk olahannya. Diperkirakan pengaruh temperatur selama proses pengolahan biji kakao dapat mempengaruhi komponen-komponen kimia yang terkandung didalamnya, khususnya katekin dan epikatekin. Untuk itu, dalam penelitian ini dilakukan pengolahan biji kakao seperti terlihat pada Gambar 6. Jenis sampel yang diambil adalah nib kakao, pasta kakao serta bubuk dan lemak kakao. Sampel bubuk dan lemak kakao merupakan hasil pengepresan pasta kakao yang dilakukan pada lima tingkat perlakuan temperatur yaitu 40-50 °C; 50-60 °C, 60-70 °C, 70-80 °C dan 80-90 °C.



Keterangan : *) Pengambilan sampel

Gambar 6. Proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya

E. Hipotesis

1. Metode analisis dapat divalidasi dan dapat digunakan untuk menganalisis katekin dan epikatekin yang terkandung dalam sampel kakao.
2. Perlakuan panas selama proses pengolahan kakao menjadi produk olahannya dapat mempengaruhi senyawa-senyawa yang terkandung dalam sampel kakao, khususnya katekin dan epikatekin

F. Cara Kerja

1. Pemilihan kondisi analisis katekin dan epikatekin

Untuk keperluan pemilihan kondisi analisis, dilakukan pembuatan larutan campuran katekin dan epikatekin masing-masing dengan konsentrasi 50 µg/ml dengan cara menimbang secara seksama masing-masing lebih kurang 10 mg standar katekin dan epikatekin. Kedua standar tersebut dimasukkan dalam labu ukur 100 ml yang sama. Kemudian dilarutkan dan dicukupkan volumenya hingga tanda batas dengan larutan metanol 30% dalam air, dikocok hingga homogen. Dipipet sebanyak 5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan ditepatkan hingga tanda batas dengan larutan metanol 30% dalam air. Selanjutnya dikocok hingga homogen. Sebanyak 5 µl larutan diinjeksikan pada alat KCKT.

Sebagai langkah awal adalah memastikan bahwa katekin dan epikatekin dapat dianalisis menggunakan metode dan peralatan analisis yang digunakan. Metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Anonim (2006) yang telah dimodifikasi.

Selanjutnya, dilakukan upaya optimasi terhadap metode analisis yang akan digunakan. Dalam penelitian ini dilakukan 3 (tiga) tahap optimasi, yaitu : (1) melakukan optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak, (2) melakukan optimasi terhadap kondisi spektrometer massa, dan (3) melakukan optimasi terhadap laju alir fase gerak.

Pada tahap optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak, kromatografi dilakukan secara gradien dengan fase gerak A terdiri atas larutan asam format 0,1 % dalam air deionisasi dan fase gerak B merupakan campuran metanol-asetonitril (50:50). Laju alir fase gerak diatur pada kecepatan 0,6 ml/menit. Perubahan komposisi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak

Waktu (menit)	(% B)					
	1	2	3	4	5	6
0	10	10	10	10	10	10
15	20	40	30	35	40	35
20	20	50	40	40	40	40
30	60	60	60	60	60	50
35	60	60	60	60	60	60
35,1	10	10	10	10	10	10

Masing-masing kondisi di atas dicatat waktu retensinya, dihitung areanya, serta jumlah lempeng teoritis. Kondisi terpilih adalah yang menunjukkan harga lempeng teoritis (N) yang besar, HETP yang kecil, dan area yang besar.

Pada tahap optimasi kondisi spektrometer massa, dilakukan modifikasi terhadap suhu (300 °C dan 325 °C), laju alir gas nitrogen (10 dan 11 liter per menit), tekanan nebulizer (40 dan 50 psi) dan tegangan ionisasi (ESI) diatur pada -3400, -3500 dan -3600 V. Optimasi kondisi spektrometer massa selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Masing-masing kondisi di atas dicatat waktu retensinya, dihitung areanya, serta jumlah lempeng teoritis. Kondisi terpilih adalah yang menunjukkan harga lempeng teoritis (N) yang besar, HETP yang kecil, dan area yang besar.

Terhadap hasil terbaik yang telah diperoleh pada kedua tahap optimasi di atas, selanjutnya dilakukan optimasi terhadap laju alir fase gerak. Laju alir fase gerak diatur pada kecepatan 0,5; 0,6; 0,8; dan 1,0 ml

per menit. Masing-masing kondisi tersebut dicatat waktu retensinya, dihitung areanya, serta jumlah lempeng teoritis. Kondisi terpilih adalah yang menunjukkan harga lempeng teoritis (N) yang besar, HETP yang kecil, area yang besar, dan waktu retensi yang tidak terlalu cepat maupun lambat.

Tabel 3. Optimasi terhadap kondisi spektrometer massa

Parameter	Nomor prosedur					
	1	2	3	4	5	6
Suhu gas pengering (°C)	300	325	300	300	300	300
Laju gas pengering (liter/menit)	10	10	10	10	11	10
Tekanan pengabut (psi)	40	50	50	50	50	50
Tegangan fragmentasi (volt)	160	160	160	160	160	160
Tegangan penyaring ion (volt)	60	60	60	60	60	60
Tegangan frekwensi radio pada oktopol (volt)	250	250	250	250	250	250
Tegangan ionisasi (ESI) (volt)	-3500	-3500	-3500	-3400	-3500	-3600

2. Validasi metode analisis katekin dan epikatekin

a. Uji spesifisitas dan selektivitas

Sebanyak 5 µl larutan 30% metanol dalam air deionisasi diinjeksikan ke alat KCKT dengan kecepatan alir dan kondisi spektrometer massa terpilih. Hal ini dilakukan sebelum validasi metode maupun sebelum analisis sampel.

b. 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 dan 12 µg/ml. Untuk epikatekin, kurva kalibrasi dibuat dengan cara membuat satu seri larutan zat tersebut dengan konsentrasi sekitar 60, 80, 100, 120, 140, dan 160 µg/ml. Sebanyak 5 µl dari masing-masing larutan tersebut diinjeksikan ke

alat KCKT dengan kecepatan alir dan kondisi spektrometer massa 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.

c. 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.

d. 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 25%, 50%, 75% dan 100% terhadap kandungan katekin maupun epikatekin yang terdapat dalam sampel (Wollgast, 2004). Sebanyak 5 μ l dari masing-masing larutan tersebut diinjeksikan ke alat KCKT dengan kecepatan alir dan kondisi spektrometer massa terpilih. Untuk setiap konsentrasi larutan diulang sebanyak 3 (tiga) kali.

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

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

C_s = kadar total zat dalam sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_{ns} = kadar zat sebenarnya dalam sampel

C_{st} = kadar zat 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. Analisis katekin dan epikatekin dalam sampel

Ada 2 (dua) tahap dalam penetapan kadar katekin dan epikatekin dalam sampel. Kedua tahap itu adalah : yang pertama, proses penghilangan lemak dan kedua, penetapan kadar katekin dan epikatekin.

a. Proses penghilangan lemak

Sampel kakao mengandung lemak. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk menghilangkan kandungan lemak yang terdapat dalam sampel kakao tersebut. Metode penghilangan lemak yang digunakan mengacu kepada metode yang dikembangkan oleh Wollgast (2004) yang telah dimodifikasi sebagai berikut : kedalam 0,5 gram sampel ditambahkan 5 ml n-heksana kemudian dilakukan sonikasi selama 5 (lima) menit dalam *ultrasonic bath*. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 3000 g selama 10 (sepuluh) menit. Larutan n-heksana dibuang dengan cara dekantasi. Proses ini diulang sebanyak 2 (dua) kali. Endapan hasil sentrifugasi tersebut selanjutnya dikeringkan dengan cara mengalirkan gas nitrogen.

b. Penetapan kadar katekin dan epikatekin

Sebanyak lebih kurang 500 mg sampel yang telah dihilangkan kandungan lemaknya, ditambahkan larutan metanol sebanyak 4 ml dan air deionisasi sebanyak 1 ml. Kemudian diaduk menggunakan *stirrer* selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 2000 g selama 15 menit.

Diambil bagian cairannya dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml. Selanjutnya ditambahkan larutan metanol 30% hingga tanda batas. Kemudian disaring menggunakan membran Millipore 0,45 μm . Hasil saringan dimasukkan ke dalam vial ukuran 2 ml. Jumlah yang diinjeksikan pada alat KCKT sebanyak 5 μl .

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

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Pemilihan kondisi analisis katekin dan epikatekin

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 adalah metode analisis yang telah digunakan oleh Anonim (2006). Metode analisis tersebut menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi fase balik yang dilakukan secara gradien dan dihubungkan dengan detektor spektrometer massa penganalisis waktu lintas dengan kondisi analisis sebagai berikut :

KCKT

- Laju alir : 0,6 ml per menit
- Waktu operasi : 18 menit
- Fase gerak A : 0,1% asam format dalam air deionisasi
- Fase gerak B : Asetonitril : Metanol (50 : 50)
- Gradien : 0-10 menit (10-60 % B); 10-15 menit (60 %B);
15-15,1 menit (10 %B)
- Volume injeksi : 5,0 μ l

Spektrometer Massa

- Suhu gas pengering : 300 ° C
- Laju gas pengering : 10 liter per menit
- Tekanan pengabut : 40 psi
- Tegangan fragmentasi : 160 volt
- Tegangan penyangkutan ion : 60 volt
- Tegangan frekuensi radio pada oktopol : 250 volt
- Tegangan ionisasi (ESI) : (-) 3500 volt

Suatu zat dapat dianalisis menggunakan KCKT yang dihubungkan dengan detektor spektrometer massa jika zat tersebut dapat diubah menjadi molekul bermuatan, baik positif maupun negatif. Dengan demikian, analisis menggunakan instrumen ini dapat dilakukan pada modus positif maupun negatif. Digunakan modus negatif jika zat yang

akan dianalisis mengandung gugus hidroksil (OH), dan digunakan modus positif jika zat tersebut mengandung atom nitrogen (Anonim, 1998).

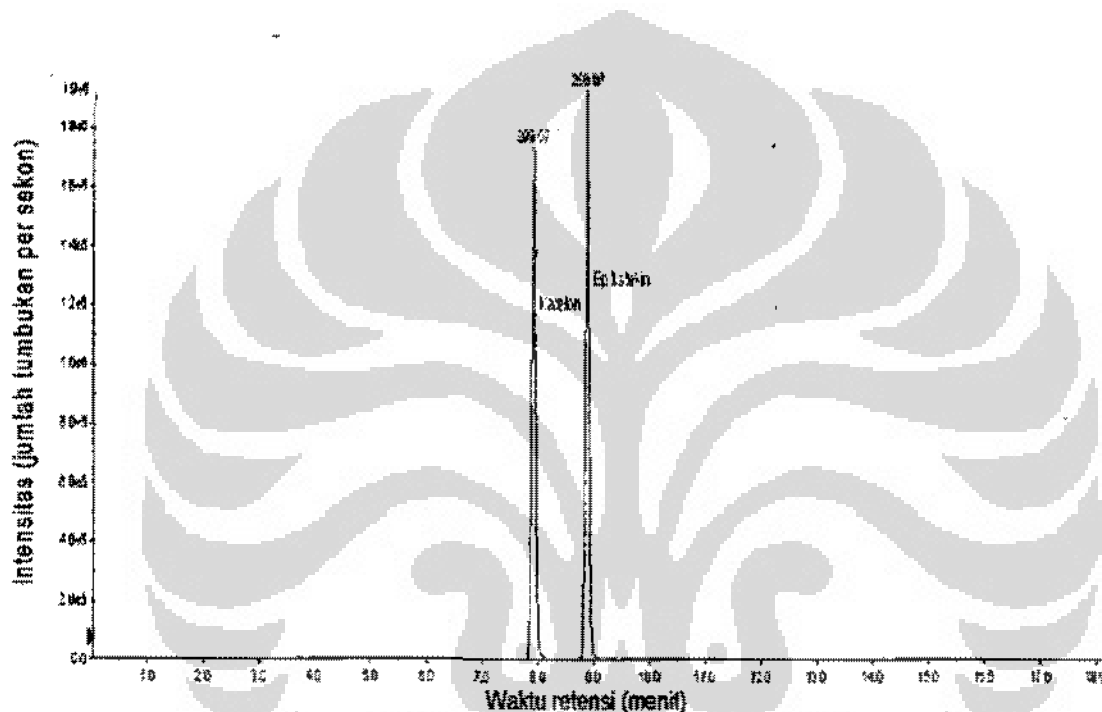
Kemudahan untuk membentuk senyawa bermuatan tersebut merupakan dasar dalam pemilihan sumber ion yang akan digunakan (Anonim, 1998). Untuk senyawa dengan polaritas sedang hingga sangat polar, sumber ion yang digunakan adalah ESI (*Electrospray Ionization*). Untuk senyawa kurang polar, tapi bukan non polar, sumber ion yang digunakan adalah APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).

Katekin dan epikatekin memiliki struktur kimia yang hampir sama. Keduanya memiliki rumus molekul $C_{15}H_{14}O_6$ dan memiliki bobot molekul 290. Keduanya termasuk kedalam senyawa polifenol (memiliki banyak gugus hidroksil). Analisis kedua zat ini jika menggunakan KCKT yang dihubungkan dengan spektrometer massa, dilakukan dengan modus negatif. Pada modus negatif ini, suatu senyawa akan diubah menjadi senyawa yang bermuatan negatif dengan cara ditarik sebuah protonnya. Untuk katekin dan epikatekin, mekanisme terbentuknya senyawa yang bermuatan negatif adalah :



Katekin dan epikatekin merupakan isomer. Secara teoritis keduanya memiliki polaritas yang sama. Dengan demikian, keduanya akan memiliki waktu retensi yang sama. Namun hasil penelusuran 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 (Anonim, 2006; Wollgast, 2004). Dalam penelitian ini juga diperoleh hasil yang sama, waktu retensi katekin (7,9 menit) lebih kecil dibanding waktu retensi epikatekin (8,9 menit). Ketika kedua zat tersebut digabung, waktu retensi keduanya juga berbeda (waktu retensi katekin 7,9 menit dan epikatekin 8,9 menit). Ini membuktikan bahwa polaritas kedua zat tersebut tidak sama (katekin relatif lebih polar dibandingkan dengan epikatekin). Juga dapat dikatakan, kolom KCKT yang digunakan (Zorbax

Eclipse XDB-C18) dalam penelitian ini cukup spesifik sehingga mampu memisahkan katekin dan epikatekin. Gambar kromatogram yang menunjukkan waktu retensi katekin dan epikatekin hasil ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom dapat dilihat pada Gambar 7. Kedua zat tersebut memiliki pola spektrum yang sama, yakni memiliki kelimpahan yang tinggi pada m/z 289,0751. Yang membedakan keduanya hanya dalam hal waktu retensinya. Gambar spektrum katekin dan epikatekin dapat dilihat pada Gambar 12 dan 13.



Gambar 7. Kromatogram standar katekin dan standar epikatekin gabungan hasil ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom

Biji kakao tidak hanya mengandung katekin dan epikatekin. Didalamnya juga terdapat senyawa lain yang mungkin memiliki waktu retensi yang hampir berdekatan dengan kedua zat tersebut. Oleh sebab itu dalam percobaan berikutnya dilakukan upaya untuk memperpanjang waktu operasi analisis dari 18 menit menjadi 40 menit dengan beberapa penyesuaian. Penyesuaian-penyesuaian tersebut meliputi baik komposisi fase gerak, kondisi spektrometer massa, maupun laju alir fase gerak yang akan digunakan, sebagaimana telah diuraikan dalam Bab III. Berikut

adalah uraian hasil optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak, kondisi spektrometer massa dan laju alir fase gerak.

1. Optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak

Pada analisis KCKT fase balik yang dilakukan secara gradien, perubahan komposisi fase gerak diubah-ubah setiap satuan waktu. Fase gerak diubah dari kondisi relatif polar menuju kurang polar. Perubahan tersebut dilakukan dengan cara meningkatkan persentase fase gerak yang kurang polar seiring dengan bertambahnya waktu. Setelah waktu tertentu, kondisinya dikembalikan lagi seperti sebelum dilakukan landaian fase gerak. Dengan adanya perubahan tersebut, diharapkan semua zat yang terkandung dalam sampel dapat dipisahkan sebelum berakhirnya waktu operasi.

Persentase fase gerak yang kurang polar dalam penelitian ini seluruhnya ditingkatkan mulai 10 persen hingga 60 persen dalam rentang waktu 0 hingga 35 menit. Yang membedakan hanya tingkat landaian dari keenam metode yang digunakan.

Percobaan diawali dengan tingkat landaian fase gerak dibuat agak melandai (tidak setajam pada saat orientasi awal). Tujuannya adalah agar katekin dan epikatekin terpisah cukup jauh namun tidak terlalu jauh. Ini juga akan memberi kesempatan kepada senyawa-senyawa lain yang memiliki polaritas diantara kedua zat tersebut agar terpisah dengan baik. Selanjutnya tingkat landaian fase gerak diubah ketajamannya dengan berbagai variasi seperti terlihat pada Tabel 2 Bab III.

Hasil percobaan selengkapnya mengenai optimasi terhadap perubahan fase gerak dapat dilihat pada Tabel 4. Tabel tersebut memperlihatkan bahwa prosedur nomor 6 memberikan hasil yang relatif lebih baik dibanding lainnya. Prosedur nomor 6 adalah prosedur dengan perubahan fase gerak : 0-15 menit (10-35 %B); 15-20 menit (35-40 %B); 20-30 menit (40-50 %B); 30-35 menit (50-60 %B); dan 35-35,1 menit (60-10 %B). Contoh kromatogram yang diperoleh dari percobaan optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak setelah dilakukan

ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom dapat dilihat pada Gambar 14.

Tabel 4. Hasil percobaan optimasi terhadap perubahan komposisi fase gerak

No.	Standard	t_R (menit)	Area (counts)	W (menit)	N	H
1	Katekin	13,5	47.686.000	1,1642	2141	0,00012
	Epikatekin	19,2	41.752.000	1,1289	4649	0,00005
2	Katekin	10,0	48.729.000	0,6703	3578	0,00007
	Epikatekin	12,3	57.958.000	0,8467	3360	0,00007
3	Katekin	11,3	47.946.000	0,7762	3372	0,00007
	Epikatekin	14,5	48.145.000	0,8467	4685	0,00005
4	Katekin	10,6	48.574.000	0,5997	4964	0,00005
	Epikatekin	13,2	57.577.000	0,8819	3605	0,00007
5	Katekin	10,0	48.787.000	0,7055	3229	0,00008
	Epikatekin	12,3	42.468.000	0,6702	5366	0,00005
6	Katekin	10,5	50.055.000	0,7056	3566	0,00007
	Epikatekin	13,2	57.149.000	0,6702	6202	0,00004

Keterangan : - Data t_R , Area dan W diperoleh langsung dari kromatogram.
 - Data N dan H dihitung menggunakan rumus seperti dijelaskan pada Bab II dengan bantuan Microsoft Excel.
 - Urutan nomor pada Tabel 4 merujuk pada perubahan %B dari Tabel 2 yang terdapat dalam Bab III.

2. Optimasi terhadap kondisi spektrometer massa

Pada KCKT, zat yang akan dianalisis (analit) berada dalam fase cair. Jika alat KCKT tersebut menggunakan detektor spektrometer massa, maka diperlukan serangkaian proses untuk menghilangkan pelarut tersebut. Proses penghilangan pelarut tersebut terkait pula dengan beberapa parameter kondisi spektrometer massa yang nantinya akan dioptimasi.

Menurut Anonim (1998), proses ionisasi dengan sumber ion ESI terjadi melalui tahapan sebagai berikut :

- (1) Fase gerak dan analit diubah menjadi butiran-butiran halus dengan bantuan pengabut (nebulizer).
- (2) Pelarut dari fase gerak diuapkan dari butiran-butiran halus tersebut.
- (3) Kerapatan muatan dalam butiran-butiran halus tersebut semakin meningkat dan setelah tetapan Raleigh, yang besarnya 10^8 V/cm³, terlampaui maka terjadi ledakan Coulomb yang akan menghasilkan butiran-butiran yang lebih halus lagi.
- (4) Di bawah pengaruh medan elektrostatik yang terdapat dalam ruang penyembur, analit bermuatan akan ditarik dari butiran-butiran halus tersebut.

Gambar 2 pada Bab II menunjukkan prinsip kerja spektrometer massa secara skematis. Pada gambar tersebut, terlihat bahwa parameter yang berpengaruh terhadap optimasi kondisi spektrometer massa adalah tekanan pengabut (*nebulizer*), tegangan ionisasi (*ESI*), suhu gas dan laju alir gas nitrogen. Dengan demikian, parameter-parameter tersebut yang dilakukan optimasi.

Kondisi awal spektrometer massa mengacu pada kondisi yang digunakan oleh Anonim (2006). Selanjutnya dilakukan perubahan terhadap beberapa parameter seperti telah dijelaskan pada Tabel 3 Bab III. Hasil proses optimasi terhadap kondisi spektrometer massa selengkapnya ditunjukkan pada Tabel 5.

Pada Tabel 5 tersebut terlihat bahwa waktu retensi katekin adalah sekitar 10,6 menit sedangkan waktu retensi epikatekin adalah sekitar 13,2 menit. Waktu retensi kedua zat tersebut relatif sama (konsisten) pada berbagai metode yang dioptimasi. Contoh kromatogram yang diperoleh dari percobaan optimasi terhadap kondisi spektrometer massa setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom dapat dilihat pada Gambar 15.

Tabel 5. Hasil percobaan optimasi terhadap kondisi spektrometer masa

No.	Standard	t_R (menit)	Area (counts)	W (menit)	N	H
1	Katekin	10,6	53.637.000	0,8114	2714	0,00009
	Epikatekin	13,2	62.564.000	0,7408	5100	0,00005
2	Katekin	10,6	66.667.000	0,7762	2974	0,00008
	Epikatekin	13,2	72.735.000	0,7056	5604	0,00004
3	Katekin	10,6	54.777.000	0,6350	4431	0,00006
	Epikatekin	13,2	64.586.000	0,7056	5615	0,00004
4	Katekin	10,6	56.339.000	0,8467	2487	0,00010
	Epikatekin	13,2	53.504.000	0,7408	5097	0,00005
5	Katekin	10,6	61.385.000	0,7761	2963	0,00008
	Epikatekin	13,2	56.162.000	0,7055	5613	0,00004
6	Katekin	10,6	55.292.000	0,8114	2709	0,00009
	Epikatekin	13,2	63.082.000	0,7056	5607	0,00004

Keterangan : - Data t_R , Area dan W diperoleh langsung dari kromatogram.

- Data N dan H dihitung menggunakan rumus seperti dijelaskan pada Bab II dengan bantuan Microsoft Excel.

- Urutan nomor pada Tabel 5 mengacu pada nomor prosedur dari Tabel-3 yang terdapat dalam Bab III.

Yang menarik dari Tabel 5 tersebut adalah bahwa prosedur nomor 2 ternyata memberikan nilai area yang paling tinggi diantara seluruh metode yang dioptimasi. Namun tingginya nilai area tidak diikuti dengan naiknya nilai N ataupun turunnya nilai H. Padahal suatu pemisahan dikatakan baik apabila memberikan nilai N yang besar atau nilai H yang kecil.

Jika Tabel 3 pada Bab III dibandingkan dengan Tabel 5 pada Bab IV terdapat hubungan sebagai berikut :

- (1) Prosedur nomor 1 pada Tabel 3 merupakan titik awal optimasi.
- (2) Ketika suhu gas pengering dinaikkan dari 300 menjadi 325 °C dan tekanan pengabut dinaikkan dari 40 menjadi 50 psi (prosedur nomor 2), terjadi peningkatan baik area maupun nilai N dari katekin dan epikatekin.

- (3) Ketika hanya parameter tekanan pengabut saja yang dinaikkan dari 40 menjadi 50 psi (prosedur nomor 3), juga terjadi peningkatan baik area maupun nilai N dari katekin dan epikatekin. Bahkan nilai N dengan metode 3 ini hasilnya masih lebih besar bila dibandingkan dengan prosedur nomor 2.
- (4) Untuk selanjutnya prosedur nomor 3 ini dijadikan acuan untuk menilai prosedur nomor 4, 5, dan 6.
- (5) Ketika tegangan ionisasi diturunkan dari -3500 menjadi -3400 volt (prosedur nomor 4), memang terjadi peningkatan pada area katekin, namun dari sisi nilai N terjadi penurunan yang cukup tajam. Hal yang sama juga terjadi pada prosedur nomor 5 dan 6. Pada saat laju gas pengering diubah menjadi 11 liter per menit (prosedur nomor 5) dan tegangan ionisasi (ESI) ditingkatkan menjadi -3600 volt (prosedur nomor 6) juga terjadi peningkatan pada area katekin, namun dari sisi nilai N terjadi penurunan yang cukup tajam.

Dengan demikian, metode yang dipilih dalam proses optimasi terhadap kondisi spektrometer massa adalah prosedur nomor 3. Prosedur nomor 3 adalah prosedur dengan kondisi spektrometer massa sebagai berikut :

- Suhu gas pengering : 300 ° C
- Laju gas pengering : 10 liter per menit
- Tekanan pengabut : 50 psi
- Tegangan fragmentasi : 160 volt
- Tegangan penyaring ion : 60 volt
- Tegangan frekuensi radio pada oktopol : 250 volt
- Tegangan ionisasi (ESI) : (-) 3500 volt

3. Optimasi terhadap laju alir fase gerak

Tahap optimasi yang terakhir adalah optimasi terhadap laju alir fase gerak. Laju alir diatur pada laju 0,5 hingga 1,0 ml per menit. Laju alir tidak diatur pada laju lebih dari 1,0 ml/menit. Pada kondisi laju alir ini, diperkirakan akan menyebabkan jarak antara waktu retensi katekin dan epikatekin akan semakin dekat. Dikhawatirkan akan mengganggu proses

pemisahan zat-zat yang memiliki waktu retensi diantara katekin dan epikatekin.

Demikian pula laju alir tidak diatur pada laju kurang dari 0,5 ml per menit. Pada kondisi ini, perlu dilakukan penyesuaian terhadap tekanan pengabut dan laju gas pengering. Menurut pedoman pengoperasian alat, jika laju alir diatur pada 0,2 hingga 0,5 ml per menit maka tekanan pengabut harus diatur pada 30 hingga 50 psi dan laju gas pengering diatur pada 8 hingga 10 liter per menit.

Hasil percobaan optimasi terhadap perubahan laju alir fase gerak dapat dilihat pada Tabel 6. Contoh kromatogram yang diperoleh dari percobaan optimasi terhadap perubahan laju alir fase gerak setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom dapat dilihat pada Gambar 16.

Tabel 6. Hasil percobaan optimasi terhadap perubahan laju alir fase gerak

No.	Laju alir (ml/menit)	Standard	t_R (menit)	Area (counts)	W (menit)	N	H
1.	0,5	Katekin	12,0	$6,36 \times 10^{-7}$	0,8466	3207	0,00008
		Epikatekin	14,7	$6,48 \times 10^{-7}$	0,7055	6934	0,00004
2.	0,6	Katekin	10,6	$5,78 \times 10^{-7}$	0,8114	2737	0,00009
		Epikatekin	13,3	$5,31 \times 10^{-7}$	0,7761	4670	0,00005
3.	0,8	Katekin	8,6	$4,44 \times 10^{-7}$	0,6350	2931	0,00009
		Epikatekin	11,2	$5,18 \times 10^{-7}$	0,7408	3640	0,00007
4.	1,0	Katekin	7,3	$3,66 \times 10^{-7}$	0,3881	6685	0,00004
		Epikatekin	9,8	$3,96 \times 10^{-7}$	0,8113	2345	0,00011

Keterangan : - Data t_R , Area dan W diperoleh langsung dari kromatogram.

- Data N dan H dihitung menggunakan rumus seperti dijelaskan pada Bab II dengan bantuan Microsoft Excel.

Pada Tabel 6 tersebut tampak bahwa dengan naiknya laju alir akan berakibat pula pada menurunnya nilai area. Hal tersebut dapat difahami mengingat bahwa bertambahnya laju alir akan berakibat pada semakin banyak jumlah partikel yang terbang.

Pada rentang laju alir antara 0,5 hingga 1,0 ml/menit ternyata yang memberikan hasil terbaik adalah fase gerak laju alir sebesar 0,5 ml per menit. Fase gerak dengan laju inilah yang selanjutnya digunakan dalam proses validasi metode analisis dan penetapan kadar katekin dan epikatekin dalam sampel kakao.

Berdasarkan dari ketiga proses optimasi tersebut didapatkan hasil kondisi analisis katekin dan epikatekin sebagai berikut :

KCKT

- Laju alir : 0,5 ml per menit
- Waktu operasi : 40 menit
- Fase gerak A : 0,1% asam format dalam air deionisasi
- Fase gerak B : Asetonitril : Metanol (50 : 50)
- Gradien : 0-15 menit (10-35 %B), 15-20 menit (35-40 %B),
20-30 menit (40-50 %B), 30-35 menit (50-60 %B),
35-35,1 menit (60-10 %B).
- Volume injeksi : 5,0 μ l

Spektrometer Massa

- Suhu gas pengering : 300 ° C
- Laju gas pengering : 10 liter per menit
- Tekanan pengabut : 50 psi
- Tegangan fragmentasi : 160 volt
- Tegangan penyaring ion : 60 volt
- Tegangan frekuensi radio pada oktopol : 250 volt
- Tegangan ionisasi (ESI) : (-) 3500 volt

B. Validasi metode analisis katekin dan epikatekin

1. Uji spesifisitas 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 5 μ l sebelum melakukan analisis sampel dan sebelum pembuatan kurva kalibrasi.

Berdasarkan hasil percobaan spesifisitas, metode analisis katekin ini cukup spesifik. Hal tersebut ditunjukkan dengan tidak adanya gangguan

di sekitar puncak katekin maupun epikatekin. Selain itu, metode analisis menggunakan KCKT yang dihubungkan dengan detektor Spektrometer Massa Waktu Lintas (*Time of Flight Mass Spectrometer*) merupakan metode analisis yang spesifik, yang dapat mengukur suatu zat berdasarkan bobot molekul ionnya. Hal tersebut dimungkinkan dengan adanya menu/fasilitas *extract ion chromatogram (XIC)* yang terdapat pada piranti *Analyst QS*. Saat dilakukan penelusuran senyawa dengan bobot molekul 289 hingga 290 Da, tidak ada satupun puncak yang menunjukkan bobot molekul tersebut. Contoh kromatogram sebelum dan sesudah dilakukan ekstraksi ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom dapat dilihat pada Gambar 17 hingga 18.

2. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas katekin dan epikatekin

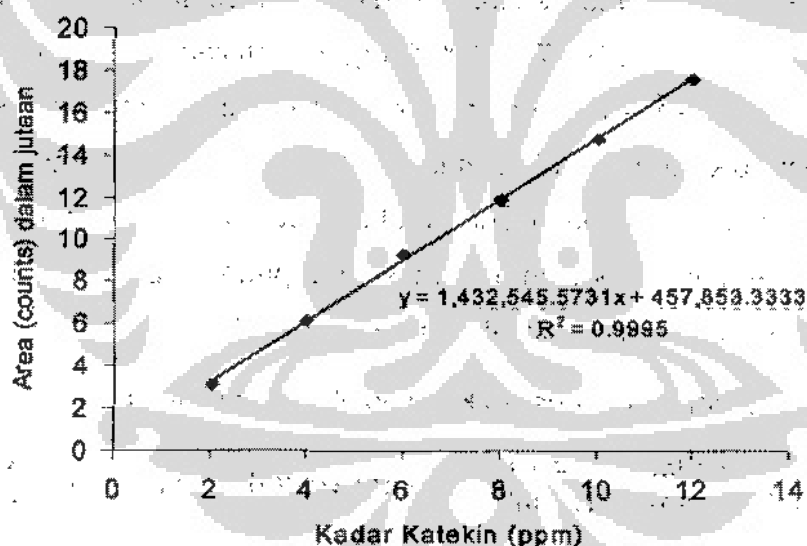
Kurva kalibrasi dibuat dengan cara memplotkan antara konsentrasi zat sebagai sumbu X dengan area sebagai sumbu Y. Dari kurva kalibrasi tersebut akan didapatkan persamaan garis regresi linier yang dinyatakan sebagai $Y = a + bX$, dengan a (*intersept*) menunjukkan titik potong kurva dengan sumbu Y dan b (*slope*) menunjukkan kemiringan kurva (*gradien*). Dari kurva kalibrasi tersebut juga akan diperoleh koefisien korelasi (r) yang menunjukkan kelinieran kurva. Suatu kurva dikatakan linier jika nilai koefisien korelasinya (r) sama dengan atau semakin dekat dengan 1. Semua perhitungan dan pembuatan kurva kalibrasi dilakukan dengan bantuan Microsoft Excel.

Berdasarkan hasil percobaan untuk pembuatan kurva kalibrasi katekin diperoleh data sebagaimana tampak pada Tabel 7. Contoh kromatogram standar katekin setelah dilakukan ekstraksi ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom dapat dilihat pada Gambar 19:

Tabel 7. Data untuk pembuatan kurva kalibrasi katekin

No.	t_R (menit)	Kadar (ppm)	Area (counts)	a (intersept)	b (slope)	Koefisien korelasi (r)
1.	12,1	2,00	3.181.000	457.853,33	1.432.545,57	0,9998
2.	12,1	4,00	6.206.200			
3.	12,1	6,00	9.275.600			
4.	12,1	8,00	11.905.000			
5.	12,1	10,00	14.769.000			
6.	12,1	12,00	17.591.000			

Dari Tabel 7 tersebut diperoleh persamaan garis regresi untuk katekin, $Y = 457.853,33 + 1.432.545,57 X$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9998. Ini menunjukkan bahwa kurva tersebut adalah kurva yang linier, dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Kurva kalibrasi katekin

Hasil yang tidak jauh berbeda juga diperoleh dengan metode KCKT menggunakan detektor DAD. Seluruhnya menunjukkan nilai koefisien korelasi $r \geq 0,999$. Bahkan ketika katekin digabung bersama dengan epikatekin nilai koefisien korelasinya masih tetap konsisten. Hasil percobaan lain pembuatan kurva kalibrasi katekin pada berbagai rentang konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Kurva kalibrasi katekin pada berbagai rentang konsentrasi

No.	Rentang konsentrasi	Persamaan regresi	Koefisien korelasi (r)	Keterangan
1	1, 5, 10, 20, 50, dan 100 ppm	$Y = -0,327 + 16,658 X$	0,9999	Digabung dengan epikatekin
2	1, 5, 10, 20, 50, dan 100 ppm	$Y = 1,291 + 3,746 X$	0,9998	Digabung dengan epikatekin
3	2, 6, 13, 26, 65, dan 130 ppm	$Y = 4,523 + 17,715 X$	0,9999	Digabung dengan epikatekin
4	1, 2, 4, 20, 50, dan 100 ppm	$Y = -6185 + 17,270 X$	0,9997	Digabung dengan epikatekin
5	0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 20,5; 51,1; dan 71,6 ppm	$Y = 2,795 + 16,243 X$	0,9999	Digabung dengan epikatekin
6	2, 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm	$Y = -0,727 + 16,573 X$	0,9997	Terpisah dengan epikatekin

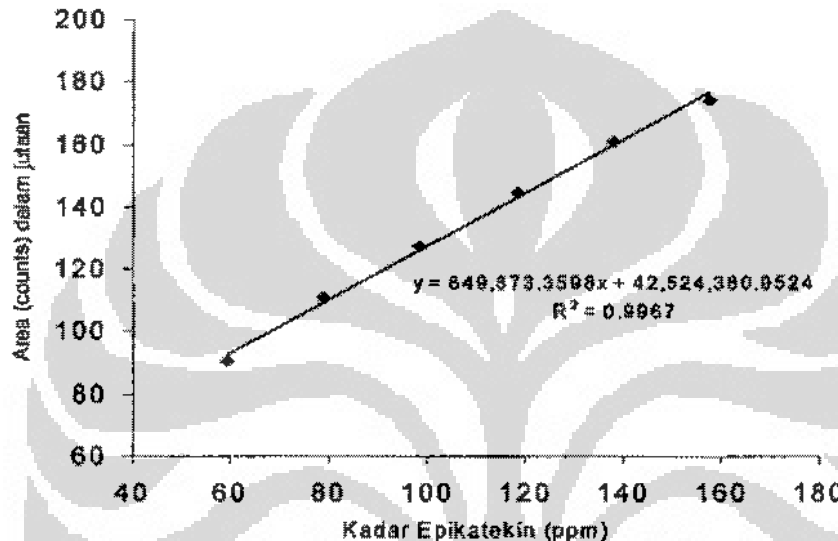
Keterangan : semua hasil di atas diperoleh menggunakan KCKT dengan detektor DAD

Sementara itu, untuk epikatekin diperoleh persamaan garis regresi $Y = 42.524.380,95 + 849.873,36 X$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9983. Persamaan tersebut diperoleh dengan cara memplotkan satu seri konsentrasi epikatekin mulai sekitar 60, 80, 100, 120, 140 dan 160 ppm. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9. Contoh kromatogram epikatekin setelah dilakukan ekstraksi ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom dapat dilihat pada Gambar 20.

Tabel 9. Data untuk pembuatan kurva kalibrasi epikatekin

No.	t_R (menit)	Kadar (ppm)	Area (counts)	a (intersept)	b (slope)	Koefisien korelasi (r)
1.	14,8	59,2	90.545.000	42.524.380,95	849.873,36	0,9983
2.	14,7	78,9	110.830.000			
3.	14,7	98,6	126.950.000			
4.	14,7	118,3	144.640.000			
5.	14,7	138,0	160.970.000			
6.	14,7	157,7	174.230.000			

Kurva kalibrasi epikatekin dapat dilihat pada Gambar 9. Dari gambar tersebut tampak bahwa sebaran titik-titik pada kurva tersebut cukup baik meskipun nilai koefisien korelasi 0,9983. Jika mengacu pada suatu ketentuan yang menyatakan bahwa suatu kurva kalibrasi yang dibuat dengan metode KCKT dinyatakan memenuhi syarat linieritas apabila memiliki koefisien korelasi (r) minimal 0,999 maka hasil yang diperoleh dalam penelitian belum memenuhi syarat.

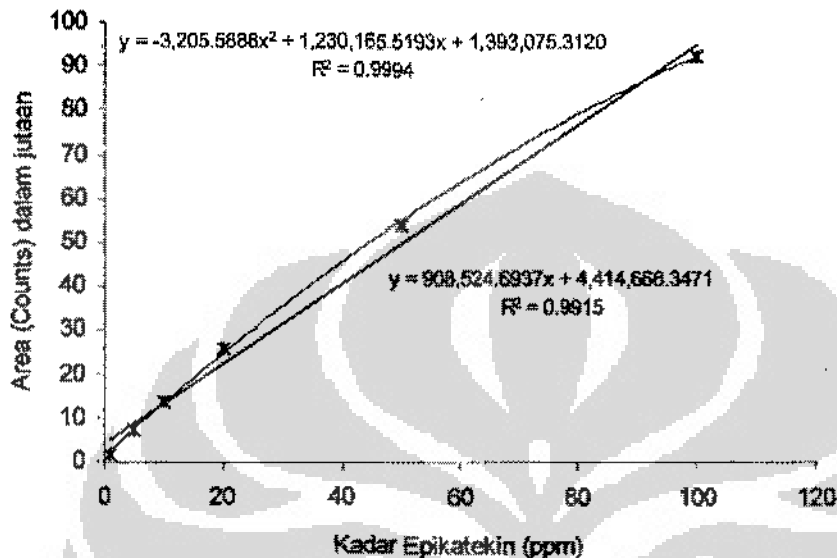


Gambar 9. Kurva kalibrasi epikatekin

Menurut Wollgast (2004), suatu kurva kalibrasi memenuhi kriteria linieritas jika memiliki koefisien korelasi (R^2) sebesar minimal 0,99 (atau setara dengan nilai $r = 0,9950$). Peneliti ini menggunakan KCKT dengan detektor spektrometer massa untuk menganalisis senyawa polifenol yang terdapat dalam sampel kakao. Dengan demikian, jika mengacu pada pernyataan yang dikemukakan oleh Wollgast tersebut, maka kurva kalibrasi epikatekin dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9983 masih memenuhi syarat linieritas.

Apabila kurva kalibrasi epikatekin dibuat pada rentang 1 hingga 100 ppm, akan didapatkan kurva yang kurang linier. Berdasarkan hasil percobaan pembuatan kurva kalibrasi epikatekin dengan konsentrasi sekitar 1, 5, 10, 20, 50, dan 100 ppm, diperoleh koefisien korelasi (r) kurva 0,9957 ($R^2 = 0,9915$ setara dengan $r = 0,9957$). Ditinjau dari sisi nilai

koefisien korelasi, kurva kalibrasi ini masih tergolong memenuhi syarat linieritas. Namun jika diamati, sebaran titik-titik kurva tersebut lebih menyerupai kurva polinomial dibanding kurva regresi (dapat dilihat pada Gambar 10).



Gambar 10. Kurva kalibrasi epikatekin yang dibuat pada rentang konsentrasi 1 hingga 100 ppm.

3. Pengukuran batas deteksi dan batas kuantitasi katekin dan epikatekin

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dari katekin dan epikatekin dihitung berdasarkan data yang digunakan dalam pembuatan kurva kalibrasi di atas. Setelah dilakukan penyesuaian terhadap data-data tersebut maka diperoleh tabel-tabel untuk kebutuhan perhitungan nilai batas deteksi dan nilai batas kuantitasi. Nilai *a* (*intersept*), nilai *b* (*slope*) maupun nilai galat baku dari *Y* harapan (*Std. Err. Of Y Est.*) diperoleh melalui perhitungan dengan bantuan Microsoft Excel.

Data yang dibutuhkan untuk perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi katekin dapat dilihat pada Tabel 10. Selanjutnya batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung menggunakan persamaan yang terdapat pada Bab II halaman 21. Dengan persamaan tersebut didapat nilai batas deteksi dan batas kuantitasi katekin sebagai berikut :

$$LOD = \frac{3 \times 133.033,20}{1.432.545,57} \quad \text{dan} \quad LOQ = \frac{10 \times 133.033,20}{1.432.545,57}$$

$$= 0,28 \text{ ppm} \quad \quad \quad = 0,93 \text{ ppm}$$

Dengan melihat nilai LOD dan LOQ tersebut tampak bahwa seluruh data yang terdapat dalam Tabel 10 berada di atas nilai LOQ.

Tabel 10. Data untuk perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi katekin

No.	t_R (menit)	Kadar (ppm)	Area (counts)	a (intersept)	b (slope)	Std. Err. of Y Est.
1.	12,1	2,00	3.181.000	457.853,33	1.432.545,57	133.033,20
2.	12,1	4,00	6.206.200			
3.	12,1	6,00	9.275.600			
4.	12,1	8,00	11.905.000			
5.	12,1	10,00	14.769.000			
6.	12,1	12,00	17.591.000			

Percobaan lain menggunakan KCKT dengan detektor DAD pada rentang konsentrasi yang sama diperoleh hasil yang tidak berbeda (batas deteksi = 0,30 ppm dan batas kuantitasi = 1,02 ppm). Seluruh titik-titik yang digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi menggunakan kedua metode tersebut memiliki nilai di atas batas kuantitasi.

Untuk epikatekin agak berbeda. Dalam penelitian ini, batas deteksi dan batas kuantitasi didasarkan atas data untuk pembuatan kurva kalibrasi dengan rentang konsentrasi antara 60 hingga 160 ppm. Data selengkapnya untuk perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi tersebut dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Data untuk perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi epikatekin

No.	t_R (menit)	Kadar (ppm)	Area (counts)	a (intersept)	b (slope)	Std. Err. of Y Est.
1.	14,8	59,2	90.545.000	42.524.380,95	849.873,36	2.026.200,91
2.	14,7	78,9	110.830.000			
3.	14,7	98,6	126.950.000			
4.	14,8	118,3	144.640.000			
5.	14,7	138,0	160.970.000			
6.	14,7	157,7	174.230.000			

Seperti halnya dengan katekin, batas deteksi dan batas kuantitasi epikatekin dihitung menggunakan persamaan yang terdapat pada Bab II halaman 21. Dengan persamaan tersebut didapat nilai batas deteksi dan batas kuantitasi epikatekin sebagai berikut :

$$LOD = \frac{3 \times 2.026.200,91}{849.873,36} \quad \text{dan} \quad LOQ = \frac{10 \times 2.026.200,91}{849.873,36}$$

$$= 7,15 \text{ ppm} \quad \quad \quad = 23,84 \text{ ppm}$$

Dengan melihat nilai LOD dan LOQ tersebut tampak bahwa seluruh data yang terdapat dalam Tabel 11 berada di atas nilai LOQ.

Jika perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi didasarkan atas data untuk pembuatan kurva kalibrasi dengan rentang konsentrasi antara 1 hingga 100 ppm, maka terdapat sejumlah titik dari kurva kalibrasi tersebut yang memiliki nilai di bawah batas kuantitasi. Akibatnya kurva kalibrasi tersebut menjadi tidak valid. Batas deteksi dan batas kuantitasi epikatekin yang dibuat pada rentang konsentrasi tersebut adalah masing-masing 11,81 dan 39,38 ppm. Percobaan lain menggunakan metode CKT dengan detektor DAD pada rentang konsentrasi 10 hingga 60 ppm diperoleh batas deteksi dan batas kuantitasi masing-masing 14,40 dan 48,01 ppm. Kedua metode tersebut menghasilkan hanya dua titik yang memiliki nilai di atas batas kuantitasi.

Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi dari katekin dan epikatekin di atas, seluruhnya didasarkan pada larutan tunggal (bukan hasil campuran keduanya). Apabila batas deteksi dan batas kuantitasi tersebut dihitung berdasarkan larutan campuran, diperoleh hasil yang lain. Berdasarkan percobaan menggunakan KCKT dengan detektor DAD pada rentang konsentrasi 0,5 hingga 130 ppm, diperoleh hasil batas kuantitasi terletak diantara rentang tersebut (dapat dilihat pada Tabel 12).

Tabel 12. Batas deteksi dan batas kuantitasi dari katekin dan epikatekin menggunakan larutan campuran kedua zat tersebut.

No.	Rentang konsentrasi	Batas deteksi (ppm)		Batas kuantitasi (ppm)	
		Katekin	Epikatekin	Katekin	Epikatekin
1	1 – 100 ppm	2,57	2,43	8,58	8,10
2	2 – 131 ppm	2,17	2,48	7,23	8,27
3	1 – 101 ppm	2,90	2,76	9,68	9,22
4	0,5 – 72 ppm	1,22	1,16	4,07	3,87

4. Uji presisi dan uji perolehan kembali katekin dan epikatekin

a. Uji presisi katekin dan epikatekin

Uji presisi yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah uji keterulangan (*repeatability*). Data dikelompokkan berdasarkan hasil untuk uji perolehan kembali, yaitu pada level 25%, 50%, 75% serta 100 persen. Data uji presisi katekin dan epikatekin diperoleh dari data untuk Uji Perolehan Kembali (UPK). Data tersebut dikelompokkan kedalam 4 (empat) kelompok berdasarkan pengelompokkan untuk uji UPK. Rangkuman hasil percobaan uji presisi katekin dan epikatekin dapat dilihat pada Tabel 13. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 18 dan 19.

Tabel 13. Data uji presisi katekin dan epikatekin

No.	Level UPK	Zat	Hasil ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sampel) dinyatakan sebagai $\bar{X} \pm \text{SD}$	KV (%)
1.	25 %	Katekin	$0,46 \pm 0,02$	4,35
		Epikatekin	$9,06 \pm 0,21$	2,32
2.	50 %	Katekin	$0,48 \pm 0,04$	8,33
		Epikatekin	$9,29 \pm 0,56$	6,03
3.	75 %	Katekin	$0,51 \pm 0,01$	1,96
		Epikatekin	$9,61 \pm 0,13$	1,35
4.	100 %	Katekin	$0,53 \pm 0,01$	1,89
		Epikatekin	$9,91 \pm 0,15$	1,51

Pada umumnya, baik katekin dan epikatekin keduanya memperlihatkan kecenderungan presisi yang semakin baik dengan meningkatnya level UPK. Penyimpangan terjadi pada uji presisi dengan level UPK 50 persen (data ketiga).

Jika ditinjau secara keseluruhan, tanpa melihat pengelompokkan berdasarkan uji UPK, akan didapatkan hasil sebagai berikut :

- Untuk katekin, diperoleh hasil rata-rata $0,50 \pm 0,04$ μg per mg sampel dengan koefisien variasi sebesar 8,00 persen. Apabila data ke-3 pada level UPK 50 % tidak disertakan hasilnya adalah $0,50 \pm 0,03$ μg per mg sampel dengan koefisien variasi sebesar 6,00 persen. Nilai koefisien variasi ini cukup besar. Namun apabila koefisien variasi dihitung menggunakan persamaan Horwitz dengan menganggap kadar zat ini dalam sampel (c) sama dengan $0,51 \times 10^{-3}$ maka didapatkan nilai 6,26 persen. Nilai ini masih sedikit lebih tinggi dari 6,00 persen. Dengan kata lain, apabila data ketiga pada level UPK 50 % tidak disertakan maka nilai koefisien variasi dari uji presisi katekin masih memenuhi syarat.
- Untuk epikatekin, diperoleh hasil rata-rata $9,47 \pm 0,43$ μg per mg sampel dengan koefisien variasi sebesar 4,54 persen. Apabila data

ke-3 pada level UPK 50 % tidak disertakan hasilnya adalah $9,54 \pm 0,36$ μg per mg sampel dengan koefisien variasi sebesar 3,77 persen. Nilai koefisien variasi zat inipun cukup besar. Namun apabila koefisien variasi dihitung menggunakan persamaan Horwitz dengan menganggap kadar zat ini dalam sampel (c) sama dengan $9,55 \times 10^{-3}$ maka didapatkan nilai 4,03 persen. Nilai ini juga masih sedikit lebih besar dari 3,77 persen. Seperti halnya dengan katekin, apabila data ketiga pada level 50 % tidak disertakan maka nilai koefisien variasi dari uji presisi epikatekin masih memenuhi syarat.

Besarnya koefisien variasi dari katekin dan epikatekin tersebut menunjukkan bahwa kadar kedua zat tersebut dalam sampel cukup beragam. Koefisien variasi katekin lebih besar dibandingkan dengan koefisien variasi epikatekin. Hal ini wajar mengingat kadar katekin dalam sampel jauh lebih kecil jika dibandingkan dengan kadar epikatekin dalam sampel. Koefisien variasi akan meningkat seiring dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis (Harmita, 2006).

b. Uji perolehan kembali katekin epikatekin

Uji perolehan kembali (UPK) dilakukan dengan menggunakan metode adisi sesuai dengan metode yang digunakan oleh Wollgast (2004). UPK dilakukan dengan cara menambahkan zat standar katekin dan epikatekin dengan konsentrasi 25, 50, 75 dan 100 persen terhadap kandungan zat tersebut dalam sampel. Kandungan zat sebenarnya yang terdapat dalam sampel dihitung dengan cara memplotkan area kromatogram *non-spike* kedalam persamaan regresi. Kadar total zat dalam sampel diperoleh dengan cara memplotkan area kromatogram *spike* kedalam persamaan regresi. Kemudian persen UPK dihitung menggunakan persamaan yang terdapat pada Bab III bagian 2.d.

Rangkuman hasil percobaan uji perolehan kembali (UPK) katekin dan epikatekin dapat dilihat pada Tabel 14. Data pada tabel tersebut dikelompokkan ke dalam 4 (empat) kelompok berdasarkan

pengelompokkan untuk uji UPK. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 20 dan 21:

Tabel 14. Data uji perolehan kembali katekin dan epikatekin

No.	Level UPK	Zat	Hasil (% UPK) dinyatakan sebagai $\bar{X} \pm SD$	KV (%)
1.	25 %	Katekin	174,10 \pm 3,02	1,74
		Epikatekin	129,62 \pm 2,61	2,01
2.	50 %	Katekin	143,41 \pm 37,73	26,31
		Epikatekin	115,41 \pm 5,67	4,91
3.	75 %	Katekin	164,89 \pm 0,49	0,30
		Epikatekin	112,39 \pm 1,39	1,24
4.	100 %	Katekin	160,03 \pm 3,78	2,38
		Epikatekin	94,35 \pm 2,47	2,61

Contoh kromatogram untuk uji presisi dan uji perolehan kembali katekin serta epikatekin dapat dilihat pada Gambar 21 dan 22. Untuk keperluan uji presisi, data yang diambil adalah data kromatogram *non-spike* saja. Sementara untuk keperluan uji perolehan kembali, digunakan data *spike* dan *non-spike*.

Hasil percobaan uji perolehan kembali, baik katekin maupun epikatekin, pada umumnya memperlihatkan hasil yang semakin mendekati nilai sebenarnya dengan semakin meningkatnya level perolehan kembali. Penyimpangan terjadi pada level UPK 50 persen (khususnya data ketiga).

Untuk katekin, seluruh nilai UPK jauh menyimpang dari nilai sebenarnya. Timbulnya penyimpangan tersebut diduga terjadi karena adanya reaksi epimerisasi (-)-epikatekin menjadi (-)-katekin. Menurut Kofink, Papagiannopoulos, dan Galensa (2007), 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 dideteksi dengan penggunaan kolom kiral. Jika digunakan kolom akiral maka waktu retensi

(-)-katekin dan (+)-katekin terletak pada rentang waktu yang sama. Oleh karenanya, puncak katekin seolah-olah semakin bertambah.

Hasil UPK katekin tersebut, menunjukkan adanya gangguan/intervensi yang disebabkan oleh epikatekin. Hal ini juga didukung data percobaan UPK lainnya menggunakan KCKT dengan detektor DAD. Dalam percobaan ini hanya katekin yang ditambahkan. Nilai UPK yang diperoleh lebih mendekati nilai sebenarnya. Hasil persen UPK pada level 25, 50, 75 dan 100 persen berturut-turut adalah $126,48 \pm 7,41$; $108,08 \pm 7,12$; $104,10 \pm 6,28$; dan $104,67 \pm 1,05$ persen.

Sementara untuk epikatekin, nilai UPK yang diperoleh tidak terlalu jauh dari nilai sebenarnya. Hal ini menunjukkan tidak adanya gangguan yang disebabkan oleh katekin.

Berdasarkan fakta-fakta tersebut di atas, disarankan agar melakukan uji presisi dan uji perolehan kembali dengan cara menambahkan zat standar (katekin dan epikatekin) secara terpisah.

C. Analisis katekin dan epikatekin dalam sampel

1. Proses penghilangan lemak

Bobot sampel kakao yang ditimbang disesuaikan dengan jenis asal sampel serta perkiraan terhadap respon detektor. Dari percobaan pendahuluan diperoleh hasil sebagai berikut :

- Untuk sampel kakao berupa nib, pasta serta bubuk kakao, bobot sampel yang ditimbang sekitar 220 mg.
- Untuk lemak kakao, jumlah yang ditimbang dua kali lebih besar dari sampel kakao berupa nib, pasta dan bubuk kakao. Jumlah yang ditimbang sekitar 490 mg. Seluruh lemak larut bersama heksana. Setelah proses penghilangan lemak selesai, di dasar wadah masih terdapat sedikit bubuk kakao.

Dalam laporannya, Junaidi *dkk* (2007) menulis bahwa kadar lemak yang terkandung dalam biji kakao adalah 49,86 persen. Bubuk kakao

yang telah dikeluarkan lemaknya dengan proses pengolahan sebagaimana telah disebutkan pada Bab III juga masih mengandung kadar lemak yang cukup tinggi. Berdasarkan laporan hasil analisis yang dilakukan Laboratorium Analisis dan Kalibrasi Balai Besar Industri Agro, kadar lemak yang terkandung dalam sampel bubuk kakao adalah berturut-turut 36,5; 38,8; 36,7; 36,2; dan 35,0 persen untuk tiap perlakuan variasi suhu A; B; C; D; dan E. A adalah bubuk kakao yang diperoleh pada proses pengepresan yang dilakukan pada suhu 40-50 derajat Celcius, B pada suhu 50-60 derajat Celcius, C pada suhu 60-70 derajat Celcius, D pada suhu 70-80 derajat Celcius, dan E pada suhu 80-90 derajat Celcius. Dapat dikatakan jumlah lemak yang terekstrak hanya sekitar 11,06 hingga 14,86 persen saja. Hasil analisis terhadap kadar lemak yang terkandung dalam sampel bubuk kakao selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1.

Berdasarkan hal tersebut maka proses penghilangan lemak dari sampel kakao perlu dilakukan. Proses penghilangan lemak mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Wollgast (2004). Dalam metode ini, tidak secara tegas disebutkan alasan proses penghilangan lemak dilakukan 2 (dua) kali. Namun dari percobaan menggunakan sampel lemak kakao, didapatkan hasil bahwa proses penghilangan lemak tersebut belum sempurna jika hanya dilakukan sekali. Masih terdapat sebagian kecil lemak yang belum terekstrak oleh larutan pengestrak lemak (heksana). Setelah dilakukan proses penghilangan lemak yang kedua, sudah tampak sisa lemak yang belum terekstrak. Dengan demikian proses penghilangan lemak yang dilakukan dengan 2 (dua) kali sudah cukup memadai.

2. Penetapan kadar katekin dan epikatekin

Penetapan kadar katekin dan epikatekin dalam penelitian ini, selain dimaksudkan untuk mengetahui kadar kedua zat tersebut dalam sampel juga digunakan untuk menilai pengaruh perlakuan panas selama proses pengolahan kakao. Penetapan kadar katekin dan epikatekin dilakukan dengan cara mencatat area kromatogram yang dihasilkan, kemudian

kadar kedua zat tersebut dihitung menggunakan persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi.

Sebagai titik awal penilaian adalah sampel biji kakao yang telah dihilangkan kulitnya (nib). Untuk mendapatkan sampel ini hanya ada proses pengeringan pada 60 °C serta proses penggilingan ringan. Selanjutnya sampel nib ini dijadikan pasta menggunakan mesin giling. Tahap penggilingan pada tahap ini lebih kuat dibanding tahap penggilingan untuk mendapatkan nib. Terakhir adalah proses pengepresan untuk memisahkan antara bubuk kakao dan lemak kakao. Pada tahap terakhir ini, digunakan 5 (lima) tahap perlakuan panas dengan rentang suhu 50 hingga 90 °C. Hasil pengukuran kadar katekin dan epikatekin dalam sampel kakao dapat dilihat pada Tabel 15 (data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 17). Gambar kromatogram dapat dilihat pada Gambar 23 hingga 34.

Tabel 15. Kadar katekin dan epikatekin dalam sampel kakao

No.	Kode sampel	Berat sampel (mg)	Kadar zat ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sampel)		Rasio Katekin : Epikatekin
			Katekin	Epikatekin	
1.	NI	213,9	0,27	5,89	1 : 21,7
2.	PA	219,1	0,41	8,22	1 : 20,0
3.	PO	214,84 \pm 2,29*	0,55 \pm 0,02*	10,59 \pm 0,27*	1 : 19,3*
4.	LE	492,54 \pm 6,73*	tt	-(0,17 \pm 0,03)*	tdd

Keterangan : NI (sampel nib kakao), PA (sampel pasta kakao), PO (sampel bubuk kakao) dan LE (sampel lemak kakao). tt = tidak terdeteksi; tdd = tidak dapat dinyatakan.

* Hasil rata-rata dari 5 sampel.

Pada Tabel 15 tersebut, sepiantas terlihat bahwa kadar katekin dan epikatekin justru semakin meningkat dengan adanya proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya. Ini tidak sesuai dengan pernyataan beberapa peneliti seperti Wollgast (2004), Caligiani *et al* (2007), serta Kofink; Papagiannopoulos; dan Galensa (2007). Para peneliti tersebut menyatakan bahwa perlakuan panas selama pengolahan kakao

menyebabkan terjadinya penurunan kadar polifenol (termasuk di dalamnya katekin dan epikatekin) dalam sampel.

Untuk menjelaskan fenomena tersebut, dapat diajukan beberapa kemungkinan sebagai berikut :

Kemungkinan pertama, masih terikutnya kulit biji kedalam sampel nib. Akibatnya kadar katekin dan epikatekin dalam nib lebih kecil bila dibandingkan kadar kedua zat tersebut dalam pasta kakao.

Prinsip pemisahan antara kulit biji dengan daging biji yang terjadi dalam mesin giling adalah memanfaatkan pantulan yang ditimbulkan oleh piringan berputar ketika biji kakao memasuki ruang giling. Akibat pantulan tersebut, biji kakao akan membentur dinding lainnya sehingga pecah. Pecahnya biji ini disertai dengan terkelupasnya kulit dari daging biji. Ukuran pecahan biji diatur agar tidak terlalu halus dengan cara mengatur jarak antara piringan berputar dengan dinding statis ruang giling. Jika proses terkelupasnya kulit ini tidak sempurna maka kulit biji akan tetap menempel pada pecahan daging biji. Warna kulit biji dan daging biji hampir serupa sehingga menyulitkan pada saat penyortiran. Dengan demikian kulit biji ini akan ikut tertimbang sebagai nib.

Kemungkinan kedua, 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. Menurut Grieve (1995) yang dikutip oleh Junaidi dkk (2007), biji kakao memiliki komposisi seperti tampak pada Tabel 16. Tabel tersebut menjelaskan bahwa kandungan lemak dalam nib kakao sekitar 50 persen. Sementara dalam bubuk kakao, berdasarkan hasil analisis yang dilakukan oleh Balai Besar Industri Agro (dapat dilihat pada Lampiran 1), kadar lemak ini berkurang hingga menjadi sekitar 35 hingga 39 persen.

Kemungkinan ketiga, adalah faktor keragaman. Sebagaimana telah dijelaskan pada uji presisi di atas, faktor keragaman ini cukup tinggi. Pada katekin nilainya sekitar 8,0 persen dan pada epikatekin sekitar 4,5 persen.

Ketiga kemungkinan tersebut perlu dipertimbangkan jika hendak menilai pengaruh panas selama proses pengolahan kakao berdasarkan perubahan kadar katekin dan epikatekin dalam sampel.

Tabel 16. Komposisi rata-rata biji kakao

No	Komponen	Biji kering %	Biji tanpa kulit %	Kulit %
1	Air	7.93	5.58	11.73
2	Lemak	45.57	50.09	4.66
3	Pati	22.57	21.68	43.29
4	Selulosa	4.70	3.38	16.02
5	Abu	4.61	3.59	10.71
6	Protein	14.19	14.13	12.81
7	Teobromin	1.43	1.55	0.78

Metode lain yang juga dapat digunakan untuk menilai adanya pengaruh panas selama pengolahan kakao adalah dengan melihat rasio/perbandingan antara katekin dan epikatekin. Cara ini telah digunakan oleh Kofink, Papagiannopoulos, dan Galensa (2007). Yang diperbandingkan oleh para peneliti tersebut adalah antara senyawa (-)-katekin dan (-)-epikatekin. Senyawa (-)-katekin merupakan hasil reaksi epimerisasi dari (-)-epikatekin.

Adanya reaksi epimerisasi tersebut dapat diamati secara tidak langsung melalui perubahan komposisi epikatekin dan katekin. Kadar epikatekin akan berkurang sementara kadar katekin akan bertambah (ada penambahan senyawa katekin yang merupakan hasil reaksi epimerisasi epikatekin).

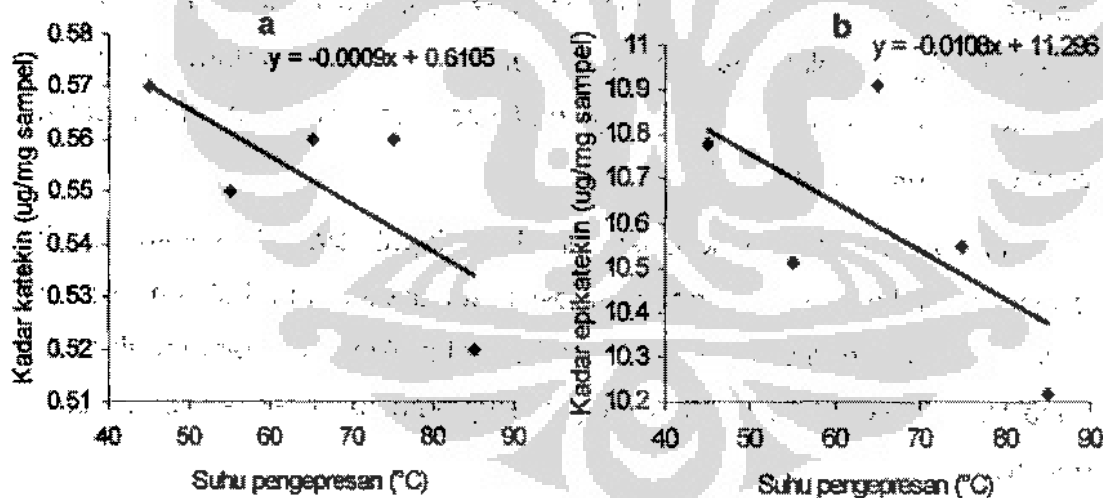
Berdasarkan rasio antara katekin dan epikatekin yang terdapat dalam sampel kakao didapatkan hasil sebagai berikut :

1. Dalam nib kakao, rasio antara katekin dan epikatekin adalah 1:21,7. Rasio ini masih lebih besar bila dibandingkan dengan pasta kakao (1: 20,0).

2. Rasio katekin dan epikatekin, dalam pasta kakao juga masih lebih besar, bila dibandingkan dengan rasio rata-rata dalam bubuk kakao (1: 19,2).

Dengan kata lain, proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya memiliki pengaruh terhadap senyawa katekin dan epikatekin yang terkandung dalam biji kakao ditinjau berdasarkan rasio antara kedua zat tersebut.

Didalam bubuk kakao sendiri yang merupakan hasil pengepresan pasta kakao pada rentang suhu 40 hingga 90 °C, sulit untuk dinyatakan bahwa perlakuan temperatur memiliki peran terhadap perubahan kandungan katekin dan epikatekin yang terdapat didalam sampel jika didasarkan atas rasio kedua tersebut. Meskipun demikian, jika dilihat berdasarkan kadar keduanya dalam sampel bubuk kakao menunjukkan kecenderungan yang semakin menurun seiring dengan naiknya temperatur, dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Tren kadar zat dalam sampel bubuk kakao, (a) katekin dan (b) epikatekin

Pada Gambar 11 tersebut, tampak bahwa tren penurunan kadar epikatekin lebih besar bila dibandingkan dengan katekin. Hal ini menguatkan dugaan bahwa epikatekin relatif kurang stabil dibanding

katekin. Pada epikatekin terjadi reaksi epimerisasi seperti telah dilaporkan oleh Kofink, Papagiannopoulos, dan Galensa (2007).

Untuk lemak kakao, pengaruh panas selama proses pengolahan kakao tidak dapat ditakukan penilaian. Keberadaan katekin pada seluruh sampel lemak kakao tidak terdeteksi. Sementara untuk epikatekin, kadar zat tersebut dalam sampel ini sedemikian kecilnya, berada jauh di bawah batas deteksi, sehingga ketika dihitung dengan kurva kalibrasi memberikan hasil negatif.

Terdapatnya epikatekin dalam sampel lemak kakao diduga karena terikutnya bubuk kakao kedalam lemak kakao selama proses pengepresan pasta kakao. Dugaan tersebut didasarkan pada hasil percobaan penghilangan lemak terhadap sampel lemak kakao. Setelah proses penghilangan lemak selesai, di dasar tabung reaksi terdapat sisa-sisa bubuk kakao yang berwarna coklat.

Selain untuk keperluan kuantitatif, analisis menggunakan kromatografi cair spektrometri massa juga dapat digunakan untuk keperluan kualitatif. Alat yang digunakan dalam penelitian ini merupakan alat kromatografi cair spektrometer massa penganalisis waktu lintas. Prinsip analisis kualitatif dengan alat ini didasarkan atas bobot molekul ion (nilai m/z) yang berhasil dideteksi, kemudian hasilnya dibandingkan dengan data kepustakaan atau zat baku. Selain itu, bisa juga didasarkan atas rumus empiris yang diperoleh dari senyawa yang berhasil dideteksi tersebut.

Berdasarkan nilai m/z yang dihasilkan, sampel nib kakao menghasilkan 7 puncak, sampel pasta kakao menghasilkan 8 puncak, dan sampel bubuk kakao menghasilkan 8 hingga 11 puncak. Puncak-puncak dengan nilai m/z 387,11; 289,07; dan 577,15 terdapat dalam seluruh sampel.

Puncak dengan nilai m/z 387,11 belum dapat diidentifikasi jenis senyawanya. Namun mengingat kadarnya dalam sampel cukup tinggi, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Puncak dengan nilai m/z 289,07 merupakan bobot molekul katekin atau epikatekin yang kehilangan satu atom H [M-H]. Hasil tersebut didasarkan pada standar katekin dan epikatekin yang digunakan dalam penelitian ini.

Puncak dengan nilai m/z 577,15 merupakan bobot molekul dimer prosianidin yang kehilangan satu atom H [M-H]. Menurut Anonim (2006), senyawa dengan m/z 577 merupakan dimer prosianidin B2 dan B5. Meskipun demikian, sulit untuk memastikan bahwa senyawa dengan nilai m/z 577,15 yang dihasilkan dalam penelitian ini merupakan senyawa dimer prosianidin yang sama dengan didapatkan oleh Anonim (2006) mengingat kondisi dan jenis alat yang digunakan tidak sama. Selain itu, ada senyawa dimer prosianidin lain yang memiliki nilai m/z 577. Sun *et al* (2007) menyebut senyawa dengan nilai m/z 577 merupakan senyawa dimer prosianidin tipe B1 dan B2. Dalam penelitian ini tidak dapat dibedakan tipe prosianidin yang terdapat dalam sampel kakao.

Sementara untuk lemak kakao, puncak yang tersisa tinggal 3 puncak. Ketiga puncak tersebut memiliki nilai m/z 206,97; 387,11; dan 289,07. Jenis senyawa yang berhasil diidentifikasi yang terdapat dalam sampel kakao secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 22.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut :

1. Kondisi analisis katekin dan epikatekin adalah sebagai berikut :

KCKT

- Laju alir : 0,5 ml per menit
- Waktu operasi : 40 menit
- Fase gerak A : 0,1% asam format dalam air deionisasi
- Fase gerak B : Asetonitril : Metanol (50 : 50)
- Gradien : 0-15 menit (10-35 %B), 15-20 menit (35-40 %B), 20-30 menit (40-50 %B), 30-35 menit (50-60 %B), 35-35,1 menit (60-10 %B).

- Volume injeksi : 5,0 μ l

Spektrometer Massa

- Suhu gas pengering : 300 ° C
- Laju gas pengering : 10 liter per menit
- Tekanan pengabut : 50 psi
- Tegangan fragmentasi : 160 volt
- Tegangan penyaring ion : 60 volt
- Tegangan frekuensi radio pada oktopol : 250 volt
- Tegangan ionisasi (ESI) : (-) 3500 volt

2. Batas deteksi dan batas kuantifikasi katekin masing-masing 0,28 dan 0,93 ppm, sedangkan untuk epikatekin masing-masing 7,15 dan 23,84 ppm.
3. Berdasarkan rasio katekin dan epikatekin, proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya mempengaruhi kandungan katekin dan epikatekin dalam biji kakao, yang ditandai dengan menurunnya rasio kedua zat tersebut.

4. Proses pengolahan pasta kakao menjadi bubuk kakao dan lemak kakao yang dilakukan pada rentang suhu 40 hingga 90 °C, tidak menunjukkan adanya pengaruh perlakuan berdasarkan rasio katekin dan epikatekin, namun bila dilihat kandungan katekin dan epikatekin yang terkandung dalam sampel menunjukkan kecenderungan yang semakin menurun.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi senyawa dengan nilai m/z 387 satuan massa atom.

DAFTAR PUSTAKA

- Andreas-Lacueva, C.; Lamuela-Raventos, R.M.; Jauregui, O.; Cassals, I.; Izquierdo-Pulido, M.; and Permanyer, J. (2000). *An LC method for the analysis of cocoa phenolics*. 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.
- Anonim (1994). *Profil Kakao Indonesia*. Direktorat Industri Hasil Perkebunan dan Kehutanan, Departemen Perindustrian dan Perdagangan, Jakarta.
- Anonim (1995). *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. Hal. 254, 1009-1010.
- Anonim (1998). *Ionization Theory*. California Analytical Division, Hewlett Packard.
- Anonim (2001). *Standard Operating Protocol (SOP) : To determine the contents of catechins and gallic acid in green tea products by HPLC Analysis*. Botanical Center for Age-Related Diseases. SOP No. CB0103.
- Anonim (2004). *Kakao Indonesia di Kancah Perkakaoan Dunia*. http://www.ipard.com/art_perkebun/nov5-04_her-1.asp 21 Januari 2008 pukul 19.58
- Anonim (2005). *LC/MS Basics*. Di dalam : *Food Safety Application in Mass Spectrometry*. Agilent Technolgy Inc., USA.
- Anonim (2006). *Rapid Screening for Flavonoids in Cocoa Using LC-TOFMS*. Leco Corporation, Form No. 203-821-294 8/06-REVO.
- Anonim (2007a). *Pengolahan Kakao*. KADIN. <http://www.kadin-indonesia.or.id/enm/images/dokumen/KADIN-104-1605-13032007.pdf> 21 Januari 2008 pukul 18.49
- Anonim (2007b). *Potensi Besar dari Kakao*. Bank Ekspor Indonesia <http://www.bexi.co.id/images/res/Opini-Potensi%20%20Dari20Kakao.pdf> 21 Januari 2008 pukul 19.03
- Anonim (2008). *Prospek dan Arah Perkembangan Agribisnis Kakao*. Litbang Deptan. <http://www.litbang.deptan.go.id/special/komoditas/b4kakao> 21 Januari 2008 pukul 19.58.

Schramm, D.D., Wang, J.F., Holt, R.R., Ensunsa, J.L., Gonsalves, J.L., Lazarus, S.A., Schmitz, H.H., German, J.B., and Keen, C.L. (2001). *Chocolate procyanidins decreases the leucotriene/prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells*. Didalam: 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.

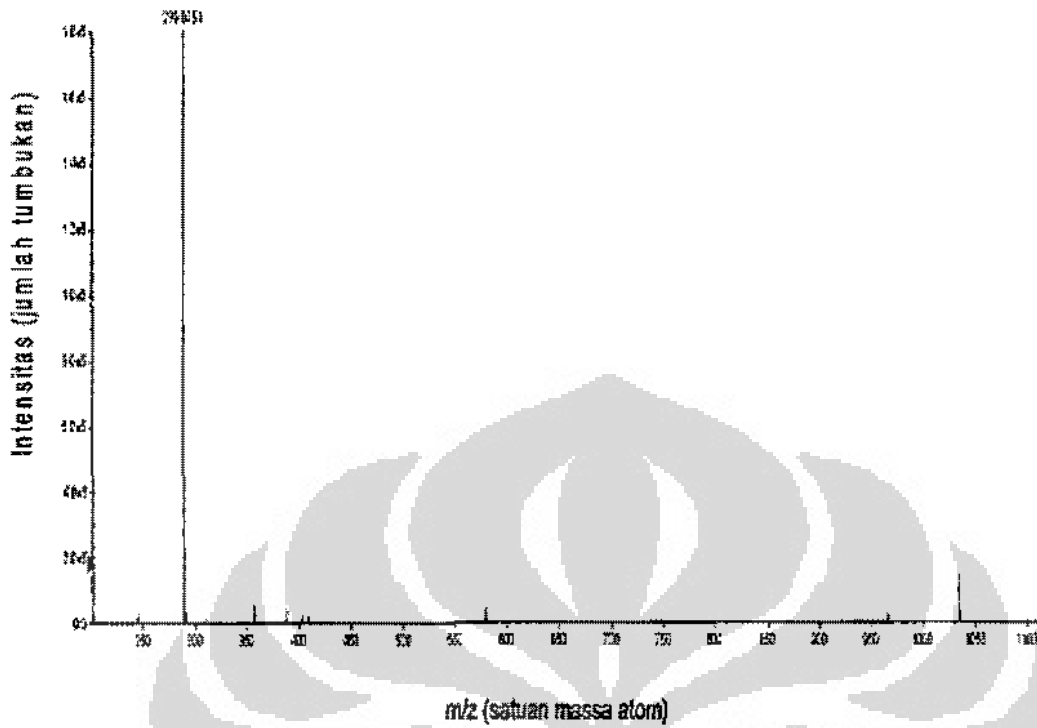
Skoog, D.A., and Leavy, J.J. (1992). *Principles of Instrumental Analysis*. 4th ed. USA. P. 628-650.

Steinberg, F.M., Bearden, M.M., and Keen, C.L. (2003). *Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health*. Didalam: 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.

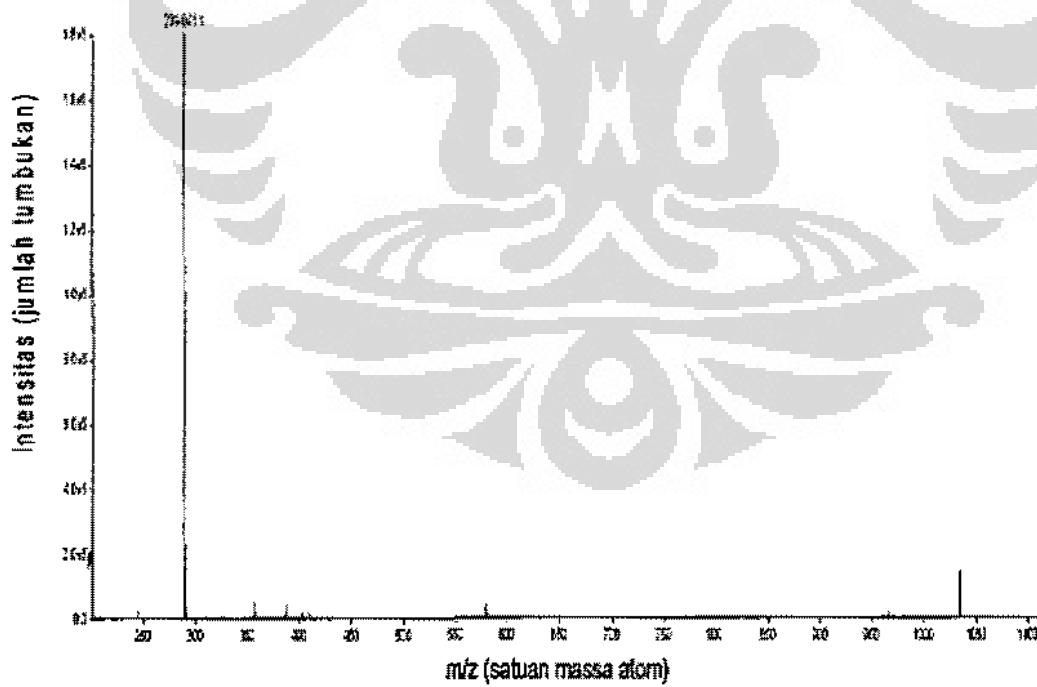
Sun, Jiangping; Liang, Feng; Bin, Yan; Li, Ping; and Duan, Changqing (2007). *Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries*. *Molecul*, **12** : 679-693 .

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.

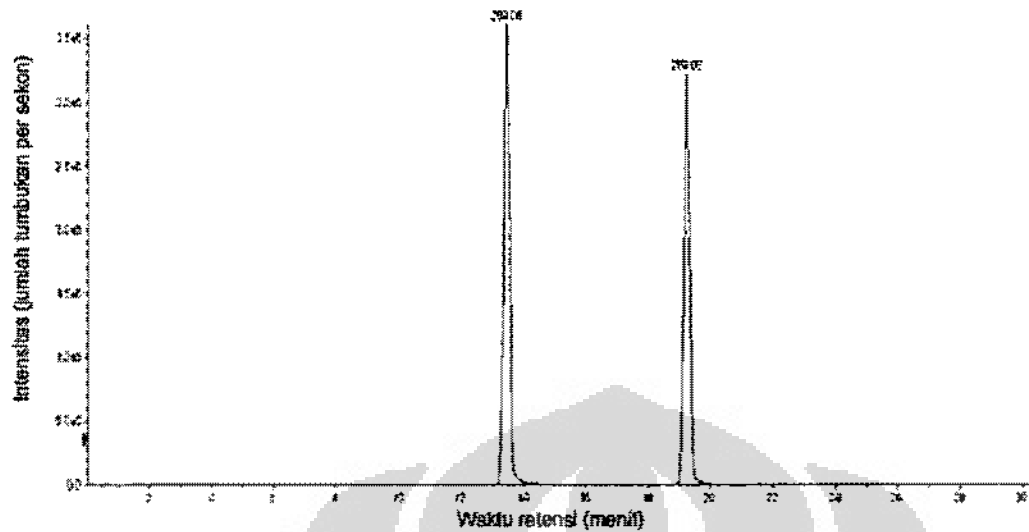




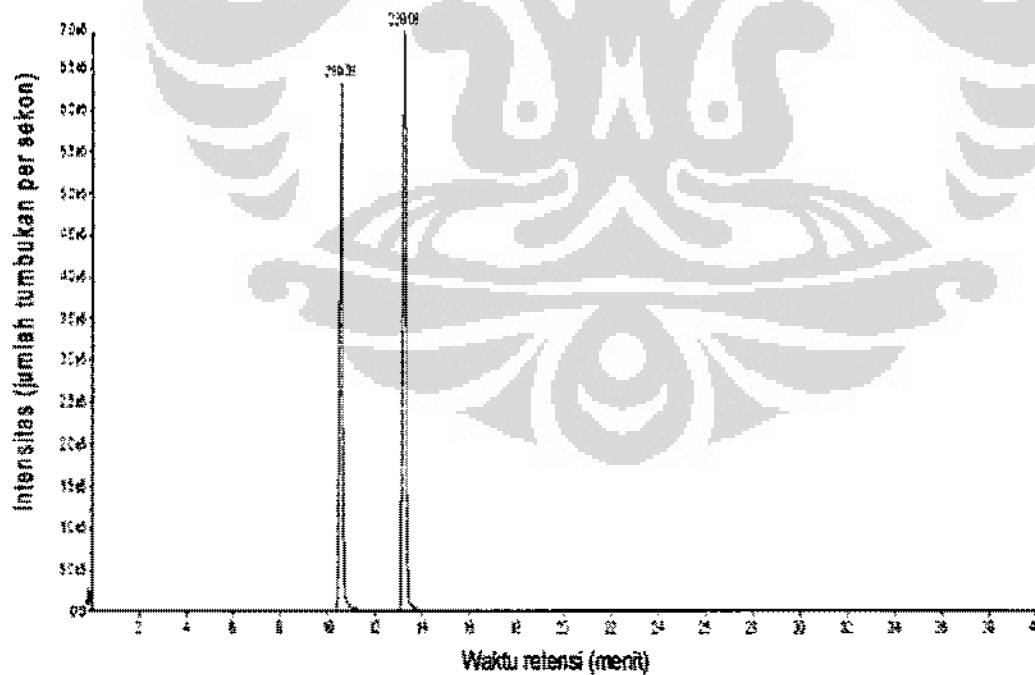
Gambar 12. Spektrum dari standar katekin



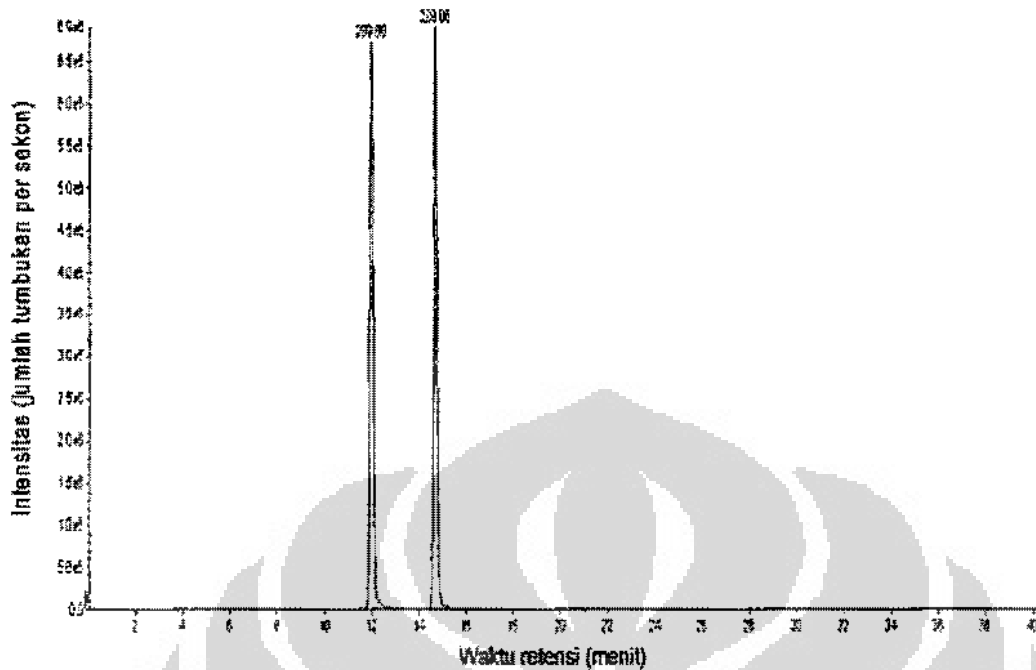
Gambar 13. Spektrum dari standar epikatekin



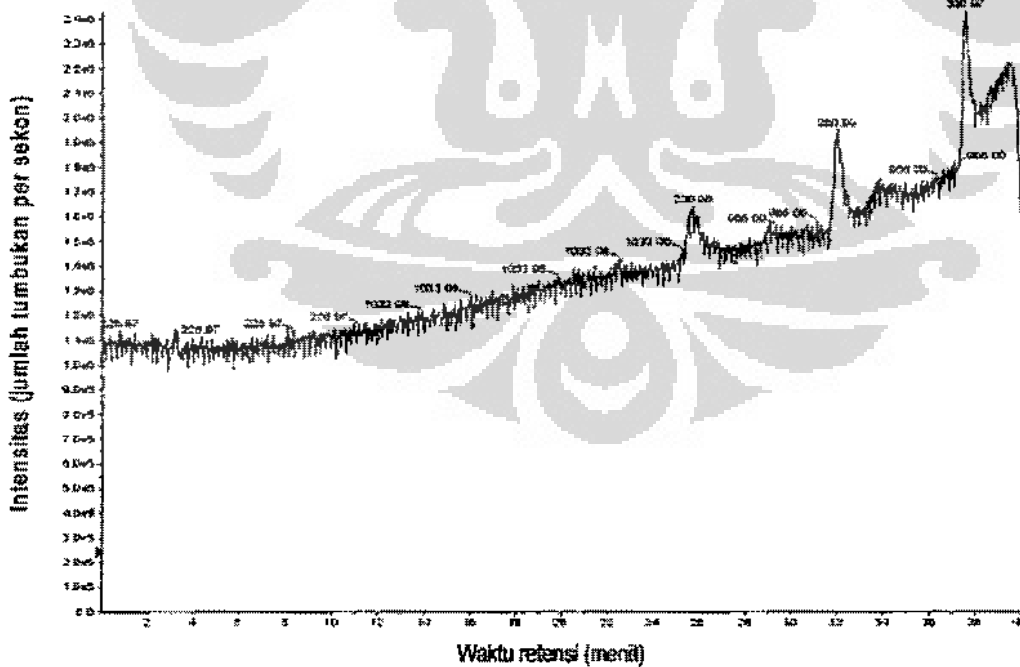
Gambar 14. Contoh kromatogram katekin dan epikatekin hasil optimasi terhadap komposisi fase gerak setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom



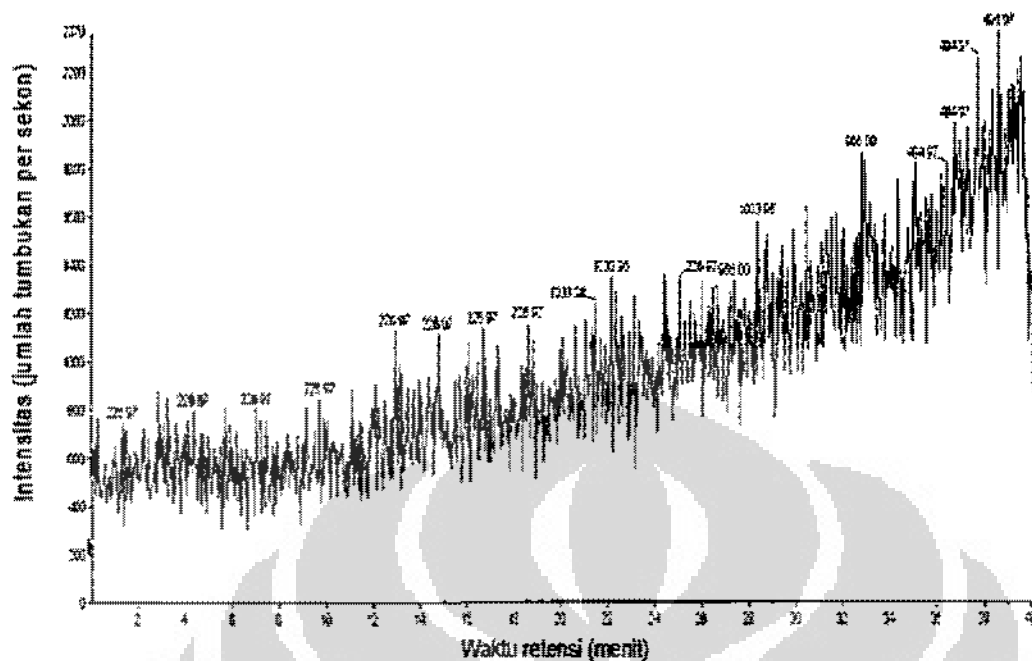
Gambar 15. Contoh kromatogram katekin dan epikatekin hasil optimasi terhadap kondisi spektrometer massa setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom



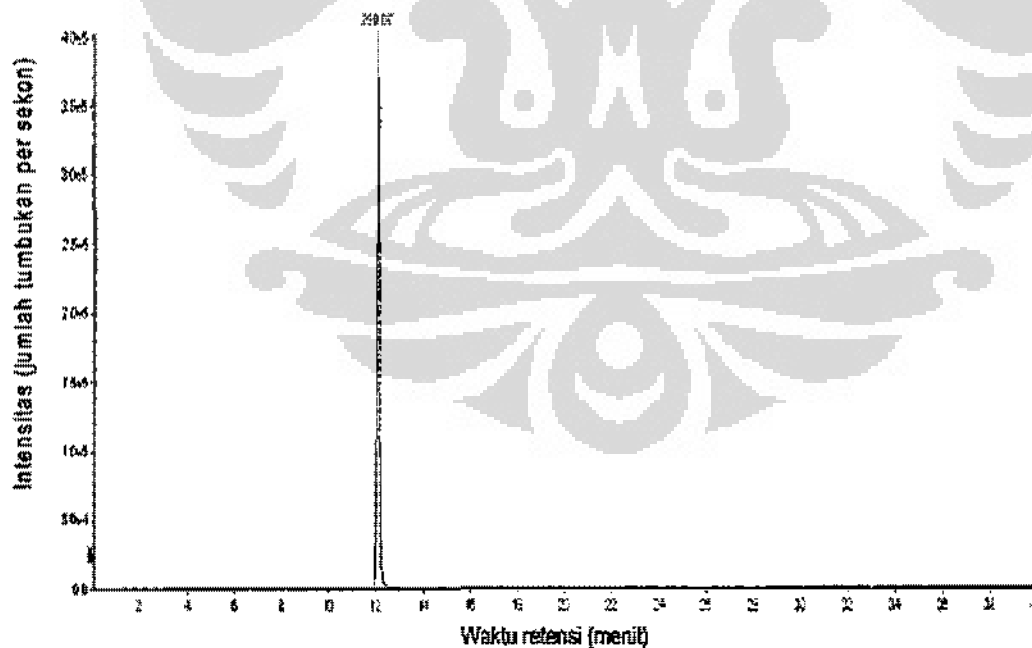
Gambar 16. Contoh kromatogram katekin dan epikatekin hasil optimasi terhadap laju alir fase gerak setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom



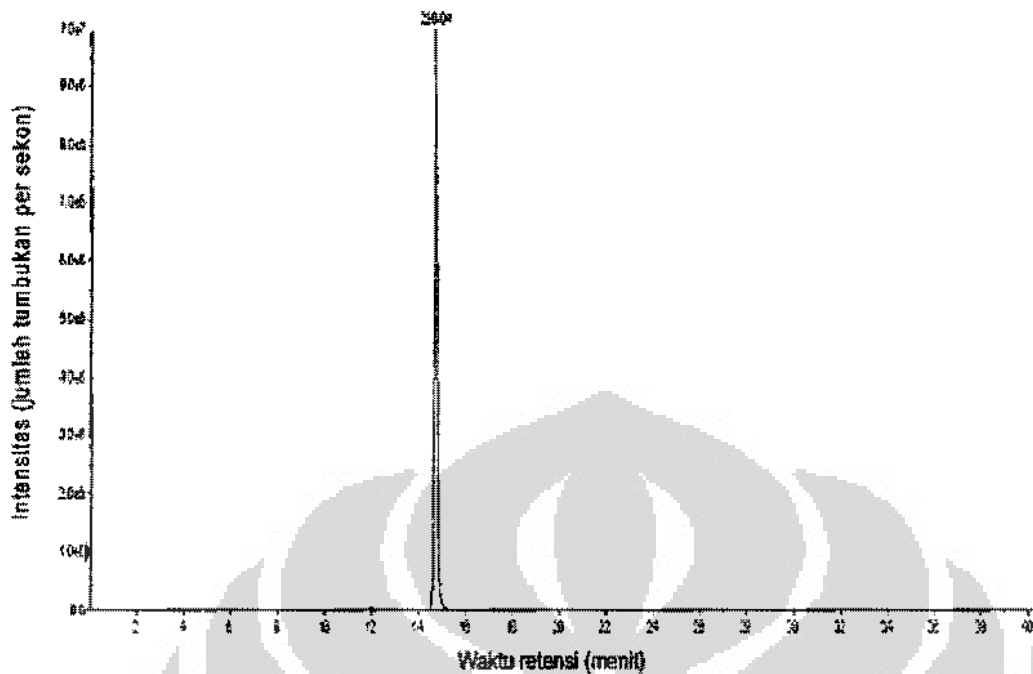
Gambar 17. Contoh kromatogram larutan metanol 30 % dalam air deionisasi sebelum dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom



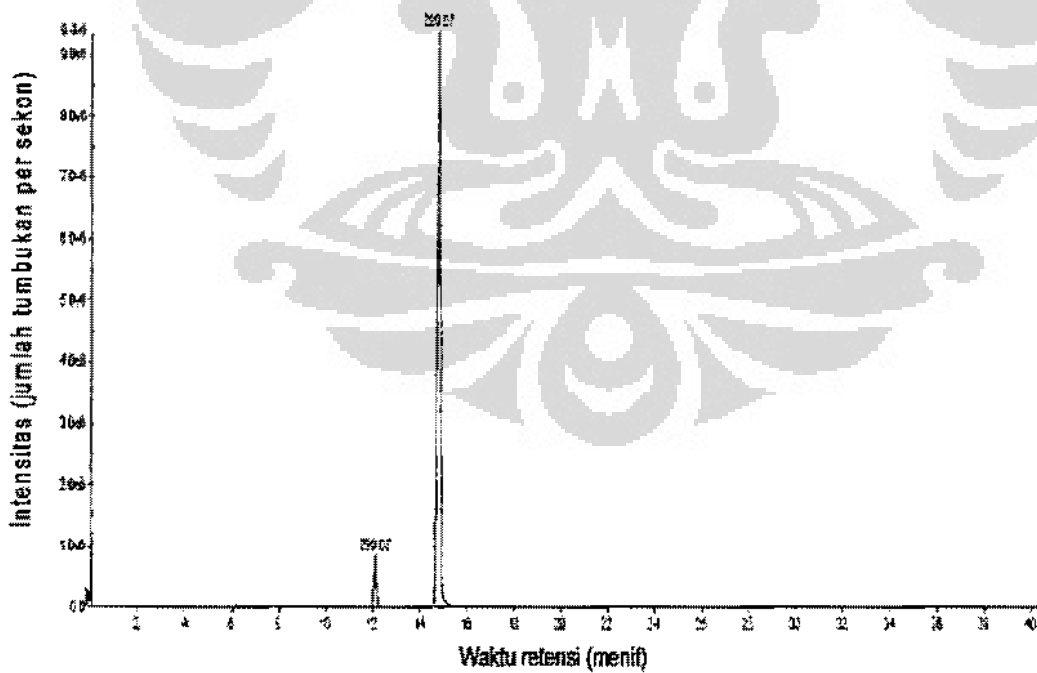
Gambar 18. Contoh kromatogram larutan metanol 30 % dalam air deionisasi setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom



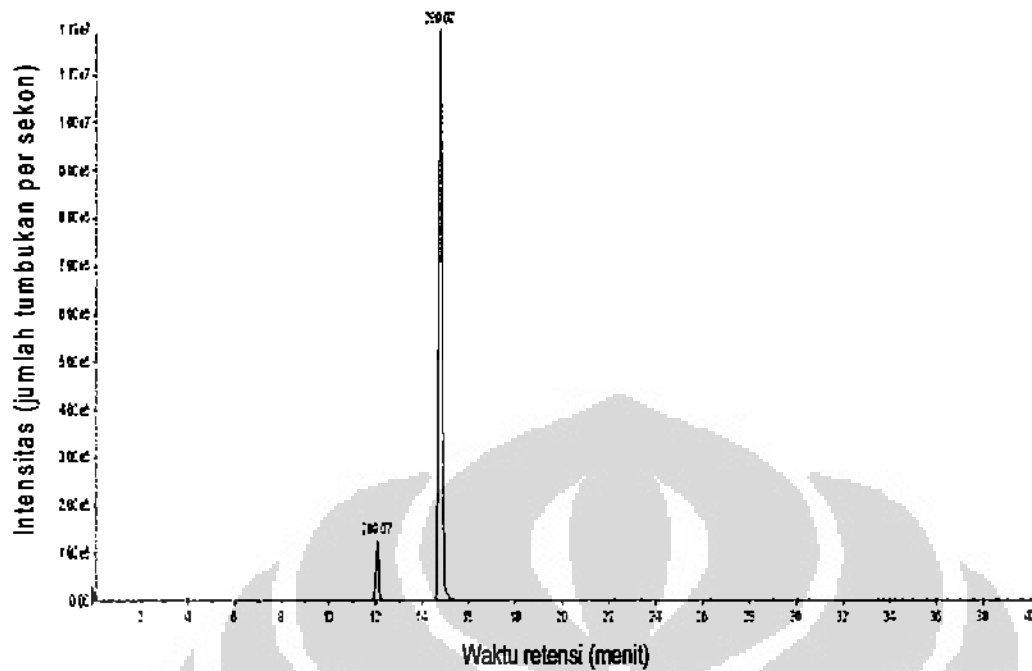
Gambar 19. Contoh kromatogram standar katekin pada konsentrasi 2 ppm setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom



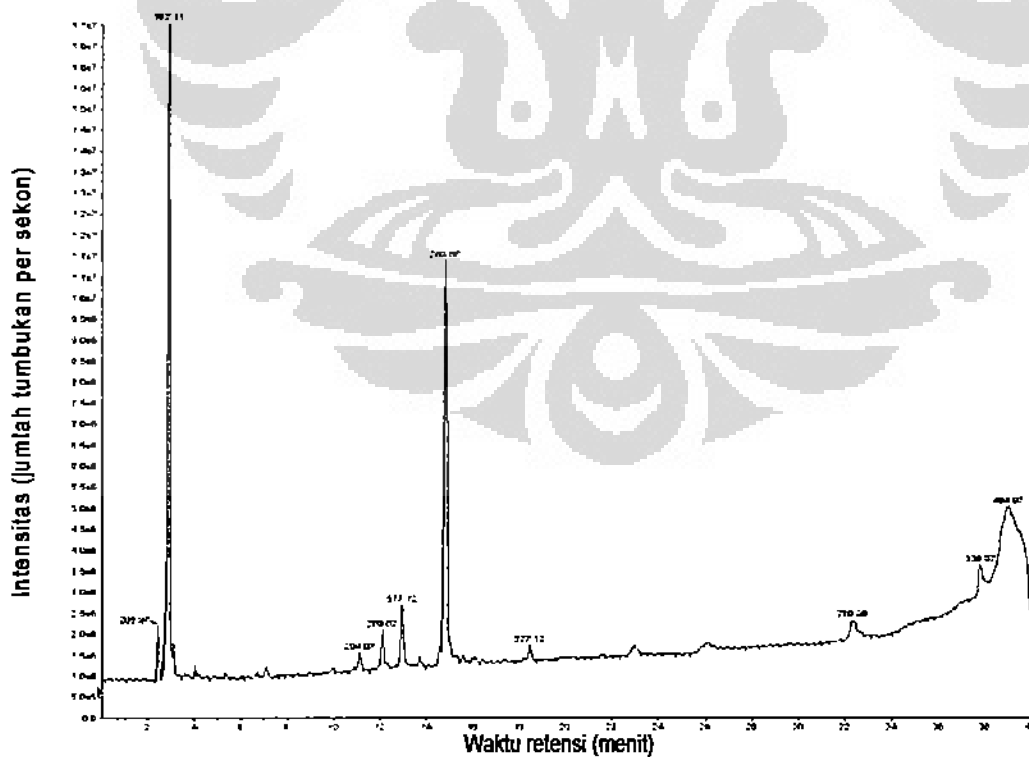
Gambar 20. Contoh kromatogram standar epikatekin pada konsentrasi 60 ppm setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom



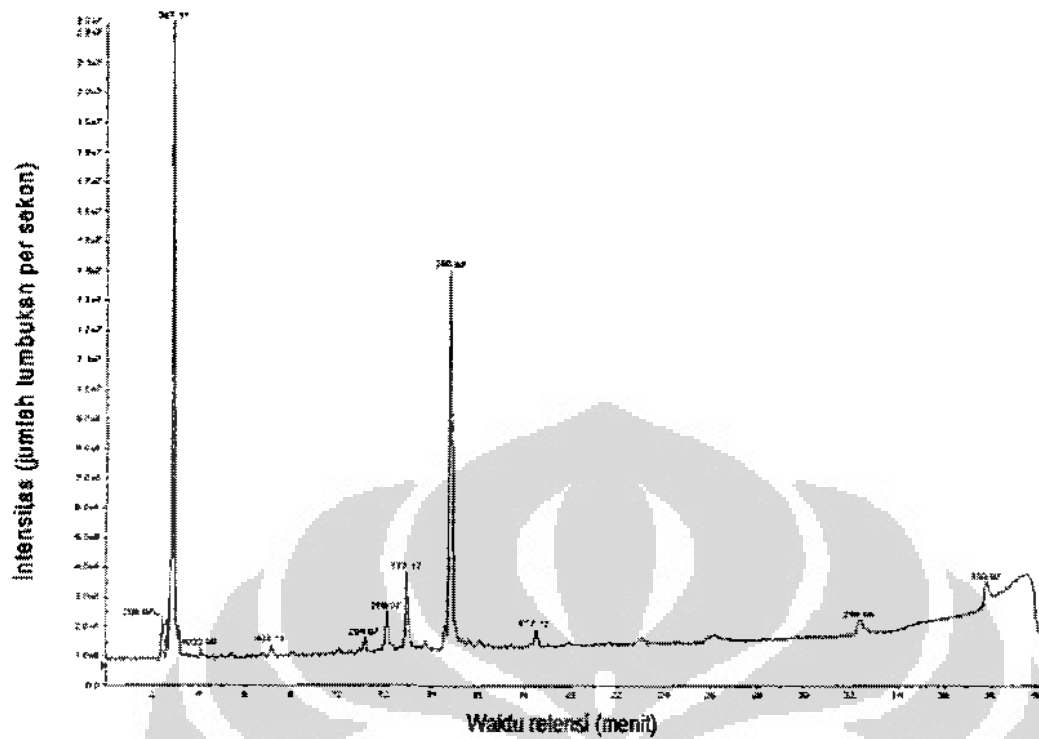
Gambar 21. Contoh kromatogram uji perolehan kembali pada level 25 persen, *non-spike*, setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom



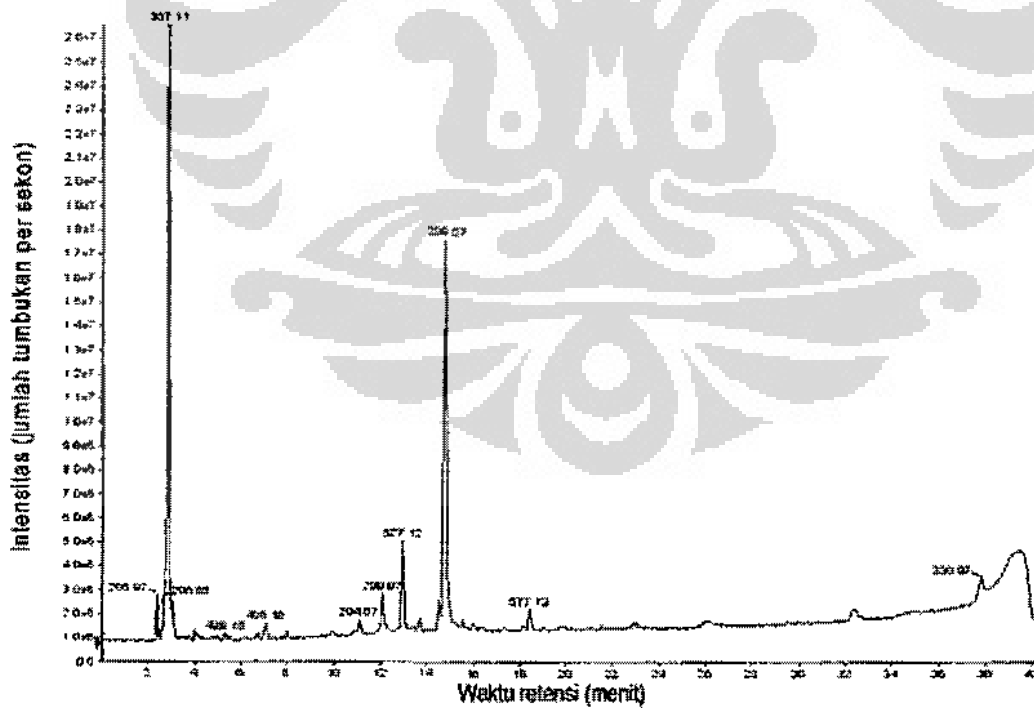
Gambar 22. Contoh kromatogram uji perolehan kembali pada level 25 persen, *spike*, setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom



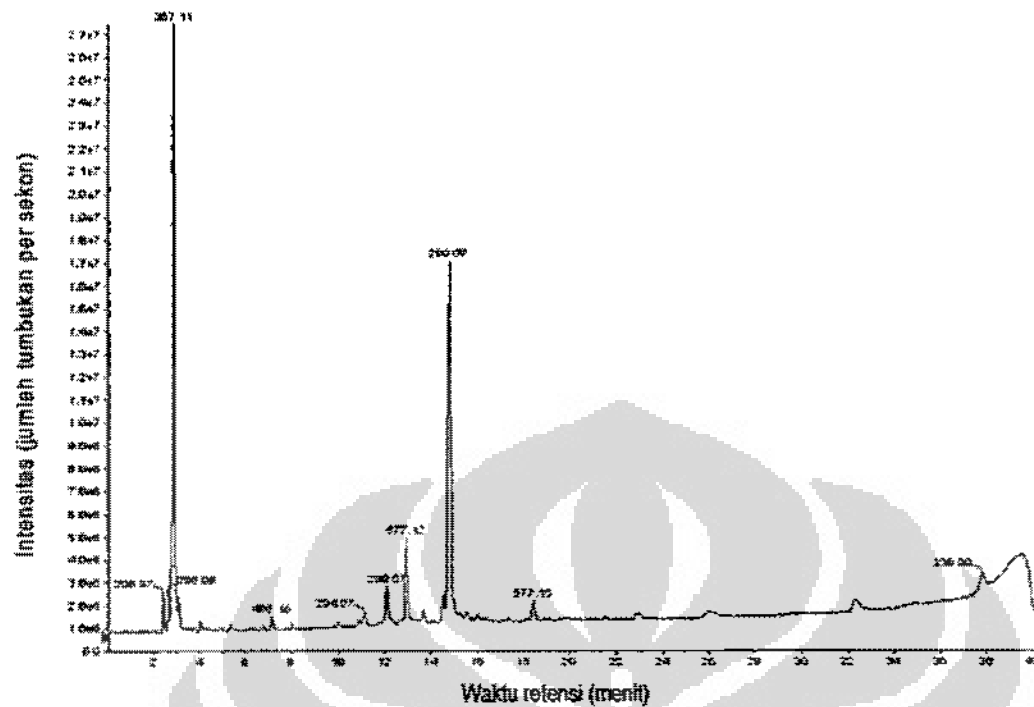
Gambar 23. Contoh kromatogram nib kakao



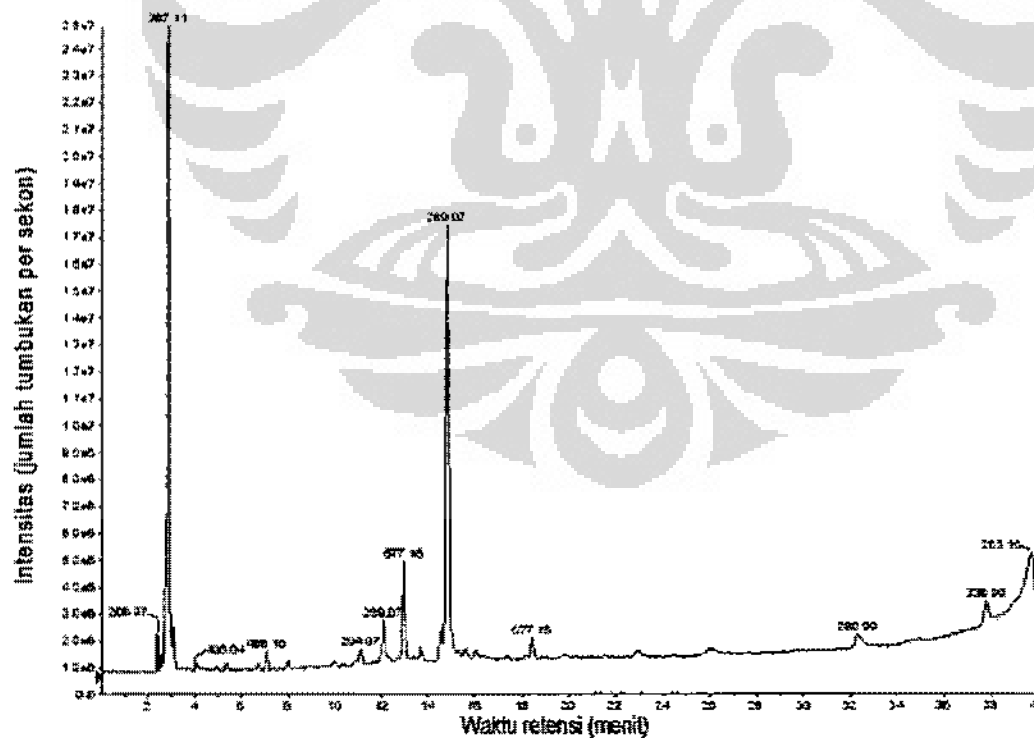
Gambar 24. Contoh kromatogram sampel pasta kakao



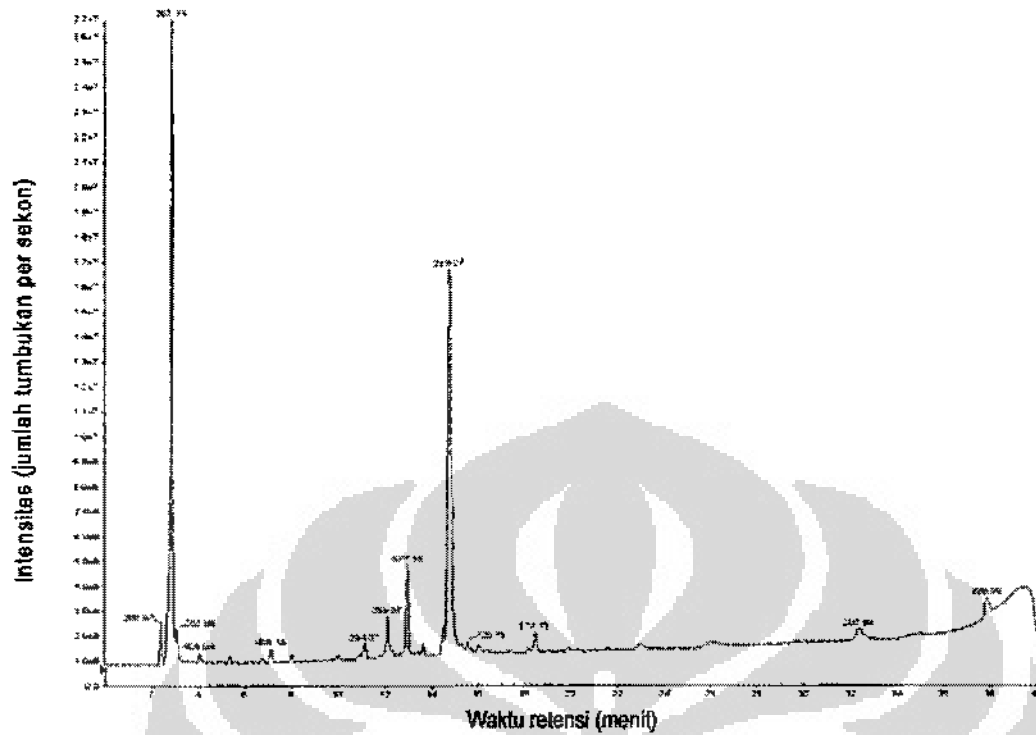
Gambar 25. Contoh kromatogram sampel bubuk kakao yang dipres suhu 40-50 °C



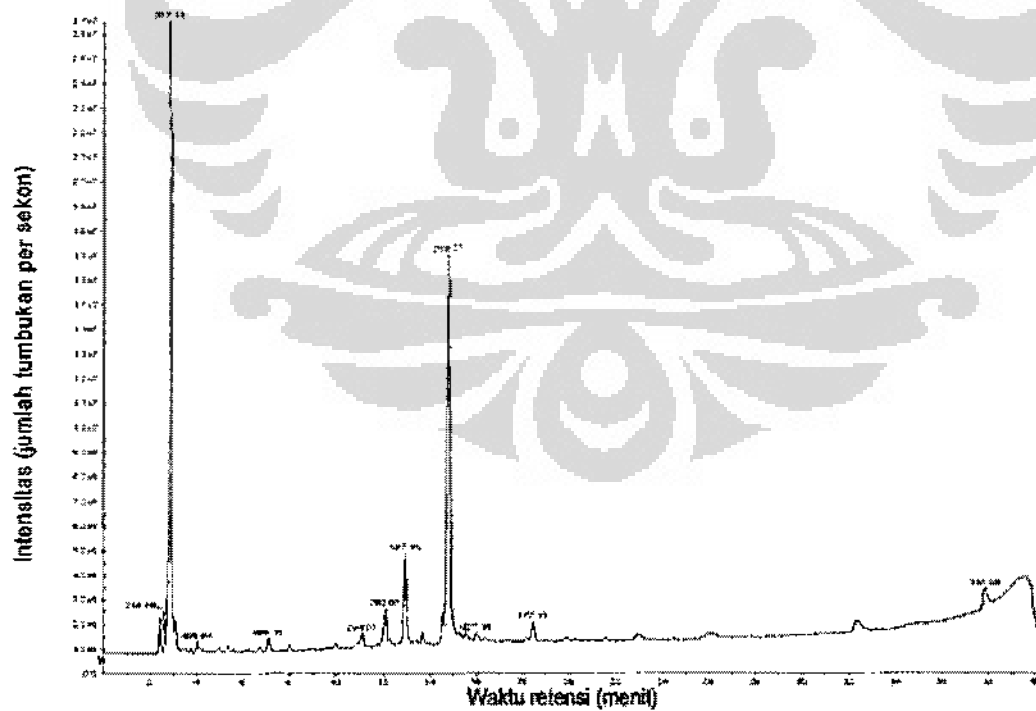
Gambar 26. Contoh kromatogram sampel bubuk kakao yang dipres pada suhu 50-60 °C



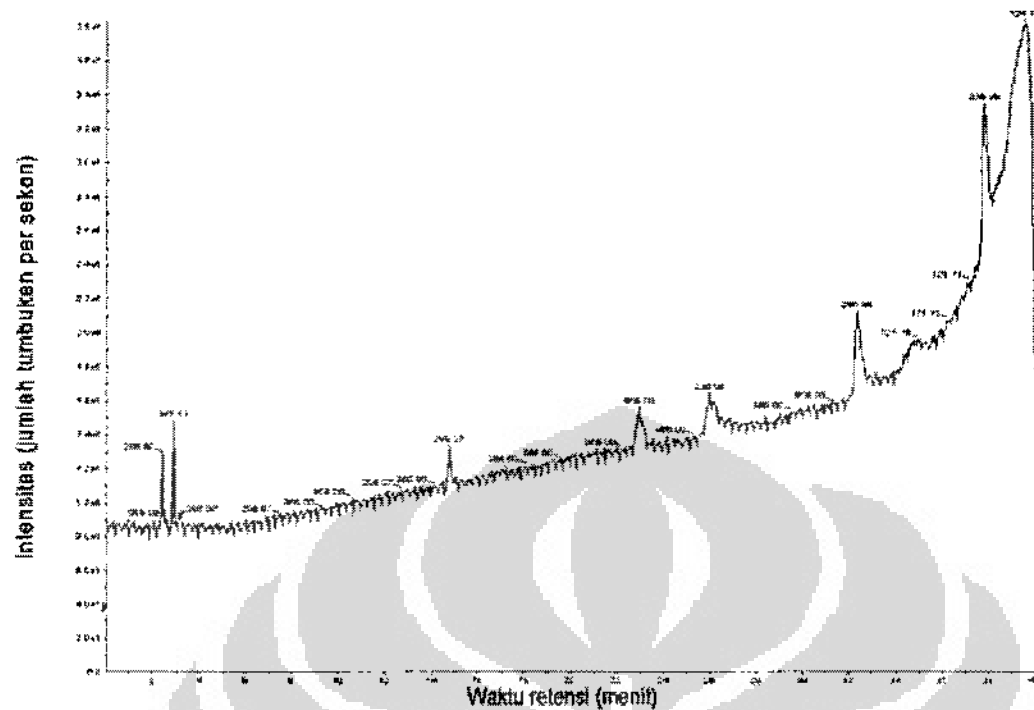
Gambar 27. Contoh kromatogram sampel bubuk kakao yang dipres pada suhu 60-70 °C



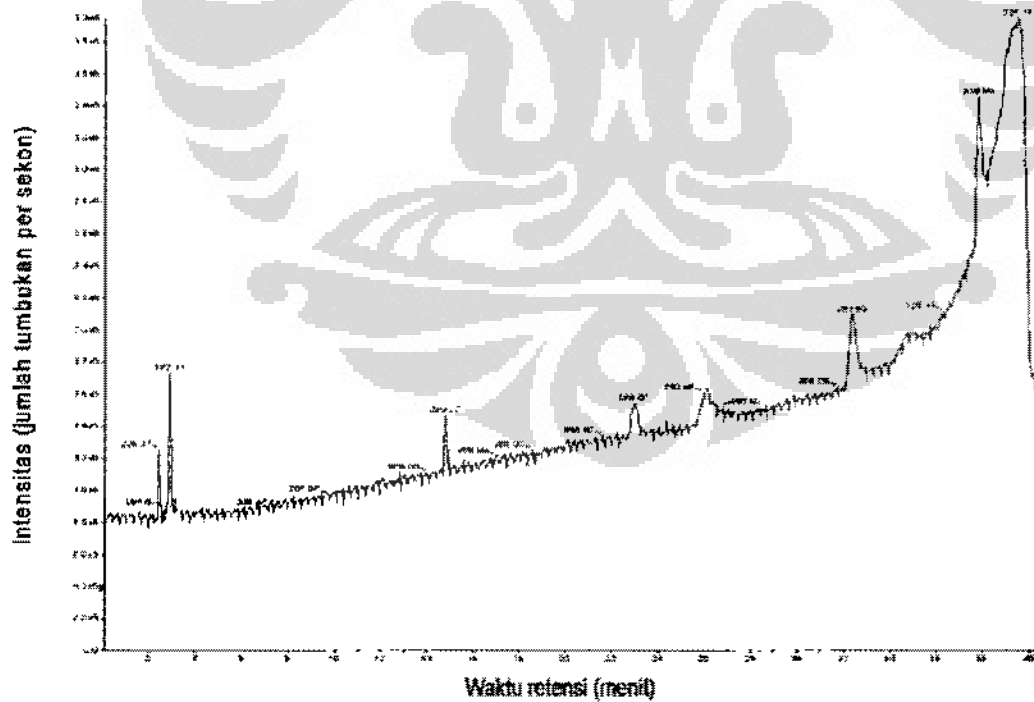
Gambar 28. Contoh kromatogram sampel bubuk kakao yang dipres pada suhu 70-80 °C



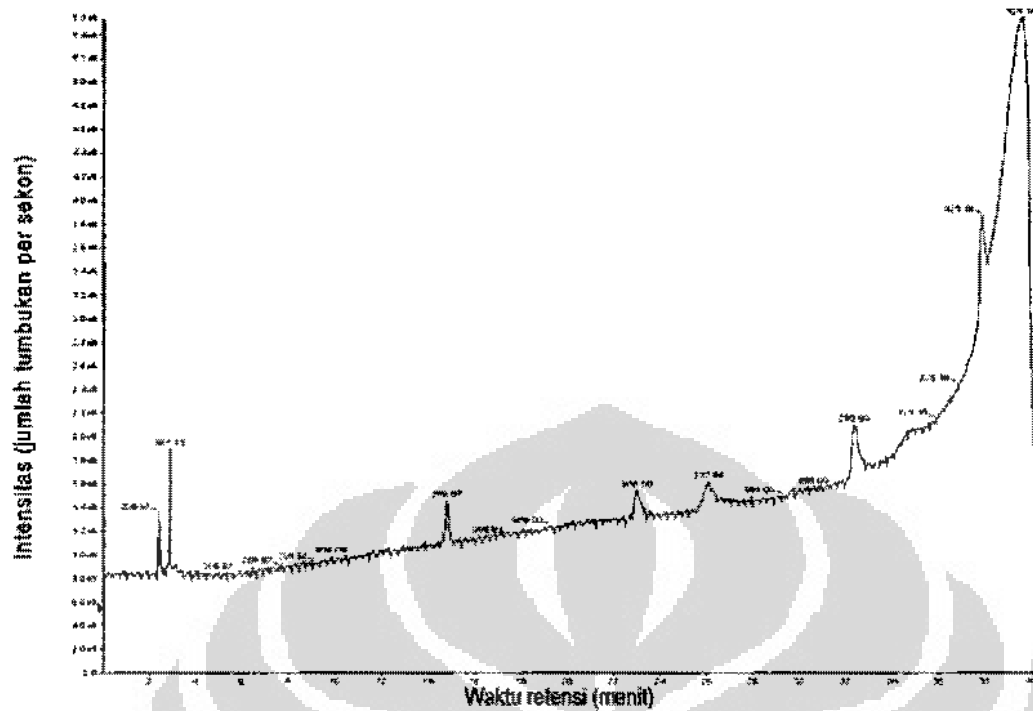
Gambar 29. Contoh kromatogram sampel bubuk kakao yang dipres pada suhu 80-90 °C



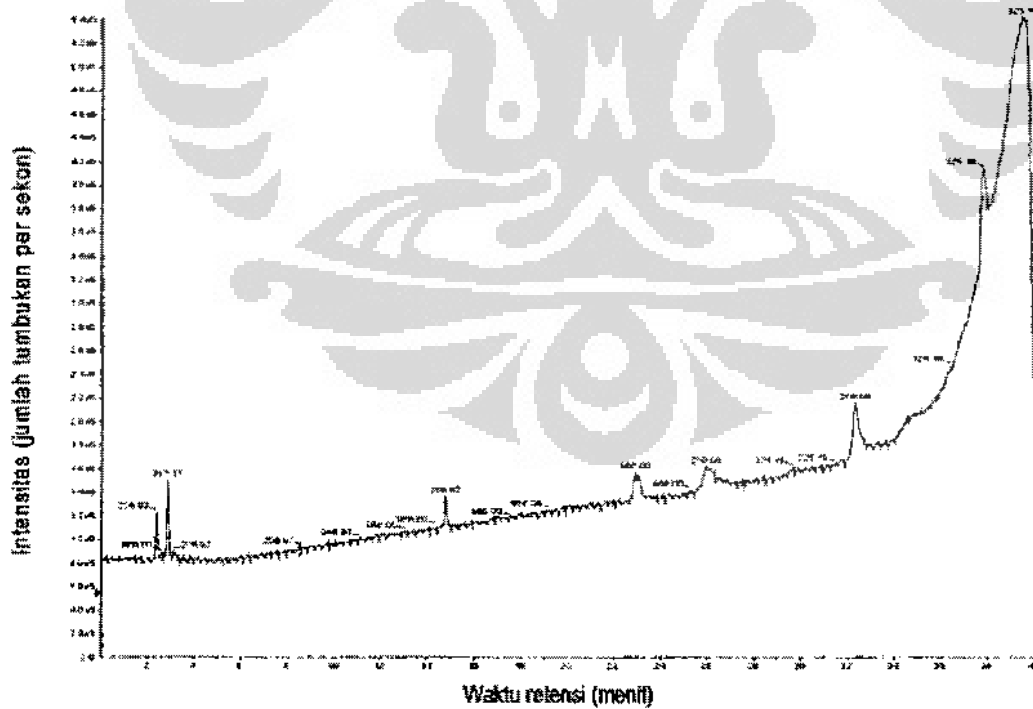
Gambar 30. Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 40-50 °C



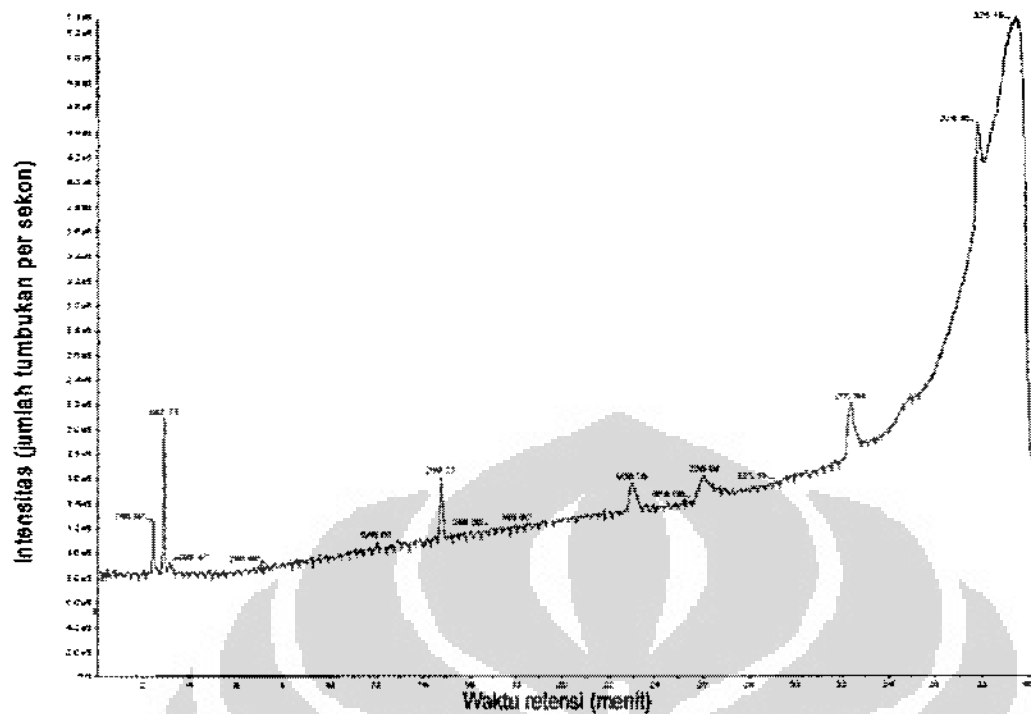
Gambar 31. Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 50-60 °C



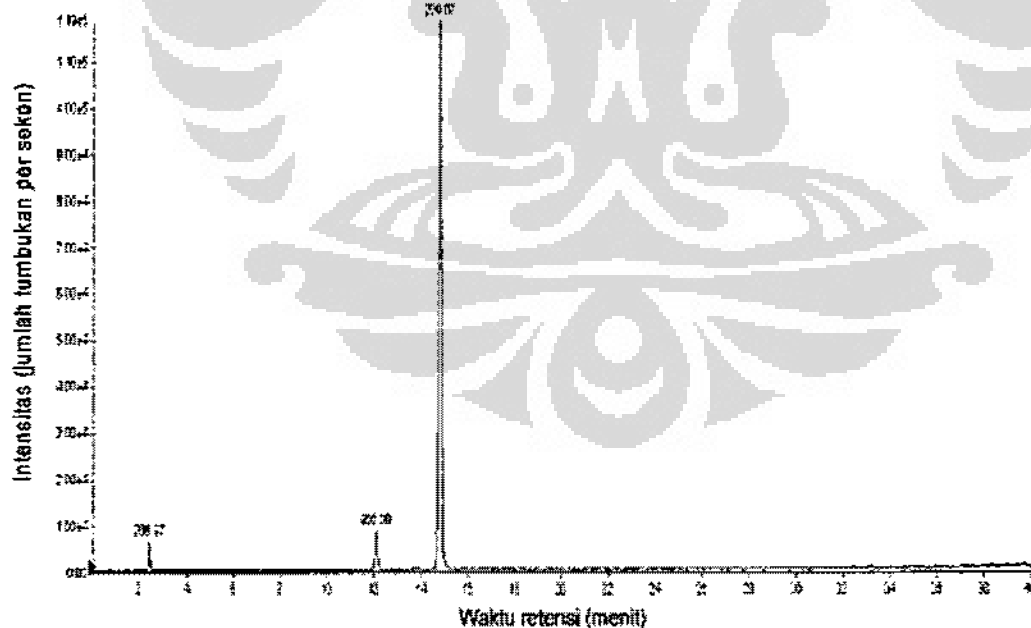
Gambar 32. Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 60-70 °C



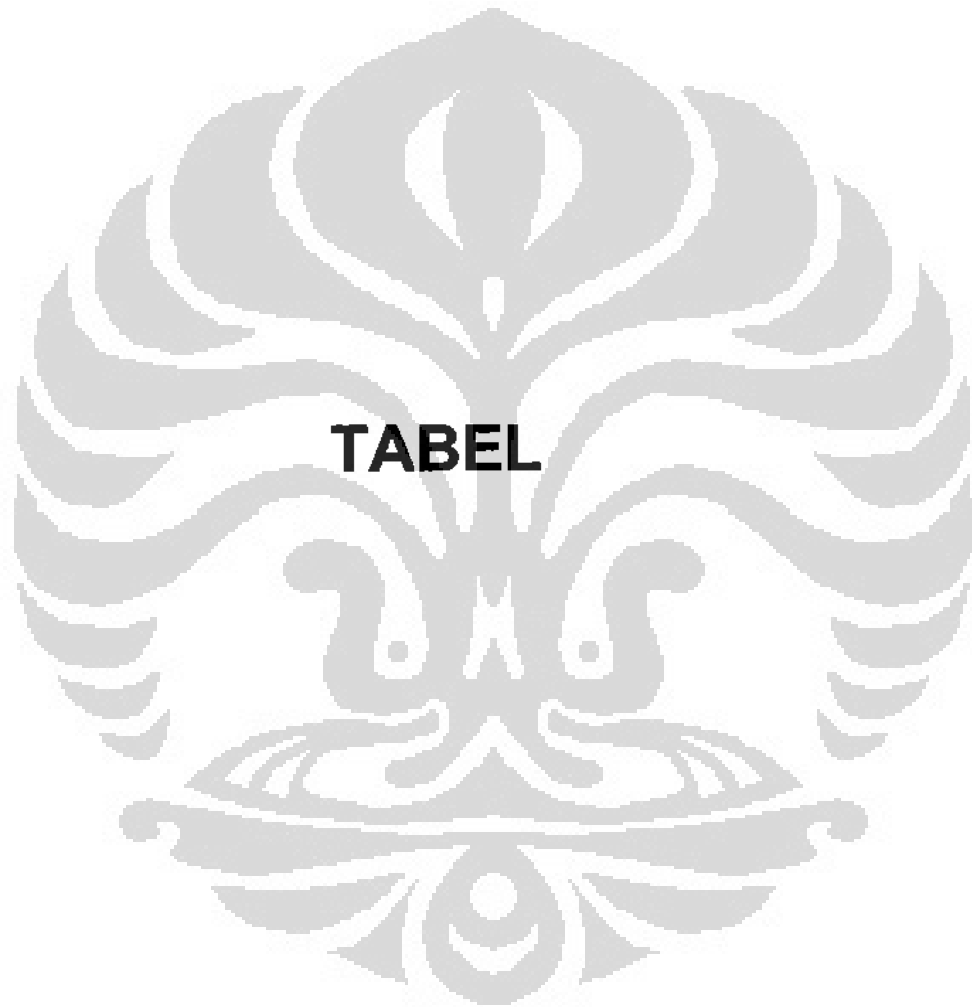
Gambar 33. Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 70-80 °C



Gambar 34. Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 80-90 °C



Gambar 35. Contoh kromatogram sampel lemak kakao yang diperoleh dari pengepresan pasta kakao pada suhu 40-50 °C, setelah dilakukan ekstrak ion pada m/z 289 hingga 290 satuan massa atom



Tabel 17. Kadar katekin dan epikatekin dalam sampel kakao (data awal)

No.	Kode sampel	Berat sampel (mg)	Kadar zat ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sampel)		Rasio Katekin : Epikatekin
			Katekin	Epikatekin	
1.	NI	213,9	0,27	5,89	1 : 21,7
2.	PA	219,1	0,41	8,22	1 : 20,0
3.	PO_A	217,4	0,57	10,78	1 : 18,9
4.	PO_B	214,5	0,55	10,51	1 : 19,1
5.	PO_C	212,4	0,56	10,91	1 : 19,4
6.	PO_D	212,9	0,56	10,55	1 : 19,0
7.	PO_E	217,0	0,52	10,22	1 : 19,5
8.	LE_A	490,8	tt	- 0,20	tdd
9.	LE_B	499,5	tt	- 0,16	tdd
10.	LE_C	482,2	tt	- 0,16	tdd
11.	LE_D	497,3	tt	- 0,18	tdd
12.	LE_D	492,9	tt	- 0,13	tdd

Keterangan : NI (sampel nib kakao), PA (sampel pasta kakao), PO (sampel bubuk kakao) dan LE (sampel lemak kakao). A, B, C, D, dan E menunjukkan tingkat perlakuan panas masing-masing 40-50; 50-60; 60-70; 70-80; dan 80-90 °C. tt = tidak terdeteksi; tdd = tidak dapat dinyatakan.

Tabel 18. Data uji presisi katekin

No.	Level UPK	Kadar katekin ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sampel)	\bar{X}	SD	KV (%)
1.	25 %	0,44 0,47 0,48	0,46	0,02	4,35
2.	50 %	0,51 0,51 0,44	0,48	0,04	8,33
3.	75 %	0,52 0,50 0,50	0,51	0,01	1,96
4.	100 %	0,53 0,55 0,53	0,53	0,01	1,89
Secara keseluruhan			0,50	0,035	8,00
Jika data ke-3 pada level 50 % dihilangkan			0,50	0,03	6,00

Tabel 19. Data uji presisi epikatekin

No.	Level UPK	Kadar epikatekin ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sampel)	\bar{X}	SD	KV (%)
1.	25 %	8,82 9,18 9,18	9,06	0,21	2,32
2.	50 %	9,57 9,66 8,65	9,29	0,56	6,03
3.	75 %	9,74 9,47 9,61	9,61	0,13	1,35
4.	100 %	9,77 10,07 9,89	9,91	0,15	1,51
Secara keseluruhan			9,47	0,43	4,54
Jika data ke-3 pada level 50 % dihilangkan			9,54	0,36	3,77

Tabel 20. Data uji perolehan kembali katekin

No.	Level UPK	Persen UPK	\bar{x}	SD	KV (%)
1.	25 %	173,46 171,45 177,39	174,10	3,02	1,74
2.	50 %	162,34 167,92 99,96	143,41	37,73	26,31
3.	75 %	164,88 164,40 165,39	164,89	0,49	0,30
4.	100 %	163,23 161,00 155,87	160,03	3,78	2,36

Tabel 21. Data uji perolehan kembali epikatekin

No.	Level UPK	Persen UPK	\bar{x}	SD	KV (%)
1.	25 %	132,38 127,20 129,28	129,62	2,61	2,01
2.	50 %	118,90 118,45 108,87	115,41	5,67	4,91
3.	75 %	111,62 111,56 114,00	112,39	1,39	1,24
4.	100 %	96,81 94,38 91,87	94,35	2,47	2,61

Tabel 22. Senyawa-senyawa yang terdapat dalam sampel kakao

No.	t_R (menit)	m/z (satuan massa atom)	Jenis senyawa	Keterangan
Nib kakao				
1.	2,4	206,97	Belum diketahui	
2.	2,9	387,11	Belum diketahui	
3.	11,1	294,07	Belum diketahui	
4.	12,1	289,07	Katekin	Baku katekin
5.	13,0	577,12	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
6.	14,8	289,07	Epikatekin	Baku epikatekin
7.	18,5	577,12	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
Pasta kakao				
1.	2,4	206,97	Belum diketahui	
2.	2,9	387,11	Belum diketahui	
3.	7,1	488,16	Belum diketahui	
4.	11,1	294,07	Belum diketahui	
5.	12,1	289,07	Katekin	Baku katekin
6.	12,9	577,12	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
7.	14,8	289,07	Epikatekin	Baku epikatekin
8.	18,5	577,12	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
Bubuk kakao hasil pengepresan pasta kakao pada suhu 40-50 °C				
1.	2,4	206,97	Belum diketahui	
2.	2,6	296,88	Belum diketahui	
3.	2,9	387,11	Belum diketahui	
4.	5,3	429,15	Belum diketahui	
5.	7,1	488,16	Belum diketahui	
6.	11,1	294,07	Belum diketahui	
7.	12,1	289,07	Katekin	Baku katekin
8.	13,0	577,12	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
9.	14,8	289,07	Epikatekin	Baku epikatekin
10.	18,5	577,12	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)

Tabel 22. Senyawa-senyawa yang terdapat dalam sampel kakao (lanjutan)

No.	t_R (menit)	m/z (satuan massa atom)	Jenis senyawa	Keterangan
Bubuk kakao hasil pengepresan pasta kakao pada suhu 50-60 °C				
1.	2,4	206,97	Belum diketahui	
2.	2,6	296,88	Belum diketahui	
3.	2,9	387,11	Belum diketahui	
4.	7,1	488,16	Belum diketahui	
5.	11,1	294,07	Belum diketahui	
6.	12,1	289,07	Katekin	Baku katekin
7.	12,9	577,12	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
8.	14,8	289,07	Epikatekin	Baku epikatekin
9.	18,4	577,15	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
Bubuk kakao hasil pengepresan pasta kakao pada suhu 60-70 °C				
1.	2,4	206,97	Belum diketahui	
2.	2,9	387,11	Belum diketahui	
3.	4,0	405,04	Belum diketahui	
4.	7,1	488,16	Belum diketahui	
5.	11,1	294,07	Belum diketahui	
6.	12,1	289,07	Katekin	Baku katekin
7.	12,9	577,15	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
8.	14,8	289,07	Epikatekin	Baku epikatekin
9.	18,4	577,15	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
Bubuk kakao hasil pengepresan pasta kakao pada suhu 70-80 °C				
1.	2,4	206,97	Belum diketahui	
2.	2,9	387,11	Belum diketahui	
3.	3,1	353,08	Belum diketahui	
4.	4,0	405,04	Belum diketahui	
5.	7,1	488,16	Belum diketahui	
6.	11,1	294,07	Belum diketahui	
7.	12,1	289,07	Katekin	Baku katekin
8.	13,0	577,15	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
9.	14,8	289,07	Epikatekin	Baku epikatekin
10.	15,6	720,18	Belum diketahui	
11.	18,5	577,15	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)

Tabel 22. Senyawa-senyawa yang terdapat dalam sampel kakao (lanjutan)

No.	t_R (menit)	m/z (satuan massa atom)	Jenis senyawa	Keterangan
Bubuk kakao hasil pengepresan pasta kakao pada suhu 80-90 °C				
1.	2,6	296,88	Belum diketahui	
2.	2,9	387,11	Belum diketahui	
3.	4,0	405,04	Belum diketahui	
4.	7,1	468,16	Belum diketahui	
5.	11,1	294,07	Belum diketahui	
6.	12,1	289,07	Katekin	Baku katekin
7.	13,0	577,15	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
8.	14,8	289,07	Epikatekin	Baku epikatekin
9.	16,0	427,18	Belum diketahui	
10.	18,5	577,15	Dimer Proisianidin	Anonim (2006)
Lemak kakao hasil pengepresan pasta kakao pada suhu 40-50 °C				
1.	2,4	206,97	Belum diketahui	
2.	2,9	387,11	Belum diketahui	
3.	14,8	289,07	Epikatekin	
Lemak kakao hasil pengepresan pasta kakao pada suhu 50-60 °C				
1.	2,4	206,97	Belum diketahui	
2.	2,9	387,11	Belum diketahui	
3.	14,8	289,07	Epikatekin	Baku epikatekin
Lemak kakao hasil pengepresan pasta kakao pada suhu 60-70 °C				
1.	2,4	206,97	Belum diketahui	
2.	2,9	387,11	Belum diketahui	
3.	14,8	289,07	Epikatekin	Baku epikatekin
Lemak kakao hasil pengepresan pasta kakao pada suhu 70-80 °C				
1.	2,4	206,97	Belum diketahui	
2.	2,9	387,11	Belum diketahui	
3.	14,8	289,07	Epikatekin	Baku epikatekin
Lemak kakao hasil pengepresan pasta kakao pada suhu 80-90 °C				
1.	2,4	206,97	Belum diketahui	
2.	2,9	387,11	Belum diketahui	
3.	14,8	289,07	Epikatekin	Baku epikatekin





DEPARTEMEN PERINDUSTRIAN RI
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 k. H. Juanda 11, Bogor 16122 Telp. : (0251) 324068, 323339 Fax. : (0251) 323339

Kepada :

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

LAPORAN HASIL UJI
TEST REPORT

Balasan surat/ Permintaan tanggal : Reply to your letter/ request dated	Nomor / Number : 1017/LNU/BU/ABICAL 11/02009
	Nomor Analisis Analysis Number : BB. 342 s.d. BB. 346
	Nomor Seri Serial Number : 1017
	Halaman : 1 dari 2
	Tanggal penerbitan date of issue : 6 Februari 2009

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

Contoh Sample (s)	: Bubuk Kakao / Coklat
Untuk analisis for analysis	: Kimia
Keterangan contoh Description of sample	: Dikemas dalam kantong plastik
Diambil dari Taken from	: -
Oleh by	: -
Tanggal penerimaan contoh Date of sample	: 3 Desember 2008
Tanggal pelaksanaan analisis Date of analysis	: 9 Desember 2008
Pengambilan contoh Sampling	: -
adalah sebagai berikut The result is as follows	: -

FAD.04a

NASIL PENGUJIAN INI TIDAK UNTUK DIGANDAKAN
DAN HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH
TERSEBUT DIATAS
PENGAMBILAN CONTOH BERTANGGUNG JAWAB
ATAS KEDEMARAN TANDING BARANG

H A S I L TEST RESULT

Nomor Seri : 1017
Serial Number

Nomor / Number : 1017/LHU/6d/ABICAL 11 / 2009

Nomor Analists : 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					
Lemak	%	36,5	38,8	38,7	36,2	35,0	SNL 01-2891-1992, butir 8.2

ASLI
ORIGINAL

Laboratorium Analisis dan Kalibrasi
Balai Besar Industri Agro

Analytical and Calibration Laboratories
Center for Agro-Based Industry

Pusat Teknik Pengujian



[Harwan Iskandar, M. Phil.]

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

FAD.04a



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



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name (-)-Epicatechin,
 > 90% (HPLC)
Product Number E1753
Product Brand Sigma
CAS Number 490-46-0
Molecular Formula $C_{15}H_{14}O_6$
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