

Validasi Metode Analisa Kafein dalam Kopi Bubuk menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Oleh :

Melania Perwitasari, M.Sc., Apt.

Maya Uzia Beandrade, M.Sc., Apt.

SEKOLAH TINGGI KESEHATAN MITRA KELUARGA

DESEMBER 2020

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN PENELITIAN

1. Judul Penelitian : Validasi Metode Analisa Kafein pada Kopi Bubuk menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
2. Jenis Penelitian : Non eksperimen
3. Jumlah Peneliti : 2

Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Melania Perwitasari, M.Sc., Apt.
- b. NIDN/NIK : 0314058702
- c. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
- d. Program Studi : Farmasi

Anggota Peneliti

- a. Nama Lengkap : Maya Uzia Beandrade, M.Sc., Apt.
- b. NIDN/NIDK : 0320088902
- c. Jabatan Fungsional : -
- d. Program Studi : Farmasi
- e. Tempat Penelitian : STIKes Mitra Keluarga

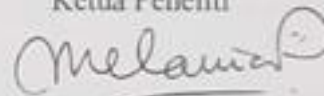
Bekasi, Desember 2020

Mengetahui,
Kepala PPPM



(Afrinia Eka Sari, S.TP, M.Si)

Mengetahui,
Ketua Peneliti



(Melania Perwitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.)

Menyetujui,
Ketua STIKes Mitra Keluarga



(Dr. Susi Hartati, S.Kp,M.Kep,Sp.Kep.An)

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kopi merupakan salah satu komoditi terbesar yang diekspor Negara berkembang termasuk Indonesia. Salah satu kandungan yang terdapat dalam kopi adalah kafein. Kafein merupakan senyawa alkaloid yang memiliki efek farmakologis psikoaktif yang digolongkan dalam penstimulan sistem syaraf pusat. Kafein merupakan alkaloid bersifat basa yang mudah larut dalam air panas. Kopi yang diseduh air panas dapat melarutkan senyawa kafein yang terdapat di dalamnya dan memberikan efek farmakologis bagi tubuh (Mejia, 2014)

Berdasarkan data *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), lebih dari 75% anak-anak (umur > 5 tahun) dan remaja (12-17 tahun) mengkonsumsi kafein secara rutin dengan rata-rata konsumsi 25 mg/ hari (6-11 tahun) dan 50 mg/ hari (12-17 tahun). Sumber utama kafein yang dikonsumsi adalah soda, kopi dan teh. Pada remaja yang beranjak dewasa konsumsi kafein meningkat menjadi 180 mg/ hari (Jennifer, 2018)

Konsumsi kafein yang berlebihan (> 400 mg) dapat mengakibatkan *takikardi*, peningkatan tekanan darah, aritmia dan gangguan tidur (Mejia, 2014). Meningkatnya kecenderungan masyarakat dalam mengkonsumsi minuman mengandung kafein serta kurangnya informasi nilai kandungan kafein dalam produk menjadikan resiko kelebihan konsumsi kafein meningkat. Hal inilah yang membuat kadar kafein dalam produk minuman yang beredar di masyarakat perlu untuk diketahui.

Dalam menganalisis kadar suatu senyawa dalam produk dibutuhkan metode analisis yang valid agar diperoleh hasil data yang sebenarnya. Beberapa metode telah dilakukan dalam analisis kafein menggunakan spektrofotometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Analisis kafein dari produk minuman kopi instan telah dilakukan oleh *Agilent Technology* menggunakan KCKT *Agilent 1260 Infinity LC System*. Penyiapan sampel uji dilakukan dengan cara 0,5 g kopi dicampur dengan 5 g MgO dan dilarutkan dalam 200 mL air pada suhu 90°C dalam *waterbath* selama 20 menit dan dinginkan pada suhu kamar, larutan disaring menggunakan filter 0,45 µm dan filtrat digunakan sebagai sampel uji pada pengenceran 1:10. Sistem KCKT yang digunakan adalah menggunakan fase gerak campuran aquadest : methanol (75:25) dengan sistem isokratik, menggunakan kolom *Agilent ZORBAX*

Eclipse Plus (4,6 x 150 mm, 5 μ m) dengan suhu 25°C, *stop time* 12 menit, volume injeksi 10 μ L, deteksi pada panjang gelombang 272 nm. Metode analisis yang dilakukan memiliki nilai parameter yang baik yaitu *Retention time* (*Rt*) 6,805 menit (RSD 0,06%), nilai koefisien korelasi 1,000, LOD 0,034 mg/L, LOQ 0,113 mg/L, presisi 0,14% (12 mg/L), akurasi 101,03% (12 mg/L) (Naegele, 2016).

Meskipun hasil analisis kafein pada kopi instan yang dilakukan oleh *Agilent Technology* sudah baik, namun apabila ada perubahan pada spesifikasi alat KCKT yang digunakan, perbedaan laboratorium, serta perbedaan jenis sampel, maka metode analisis tersebut harus divalidasi ulang. Hal ini untuk menjamin bahwa hasil yang diperoleh merupakan nilai yang sebenarnya. Perubahan yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah penggunaan alat KCKT dengan tipe *Agilent Technologies 1220 Infinity II LC*, dilakukan di laboratorium STIKes Mitra Keluarga, dengan sampel kopi bubuk dengan berbagai jenis. Suatu metode dikatakan valid apabila memenuhi beberapa parameter yaitu selektivitas ($R_s \geq 2$), linieritas ($r \geq 0,999$), ketepatan (*recovery* 1-10 ppb, 80-110%), ketelitian (CV 10%, 2,7) (Harmita, 2004).

B. Perumusan Masalah

1. Apakah metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang dikembangkan dengan perbedaan tipe KCKT, jenis sampel dan perbedaan laboratorium memenuhi persyaratan validasi?
2. Berapakah kadar kafein dalam kopi bubuk?

C. Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan metode analisis kafein yang valid menggunakan KCKT *Agilent Technologies 1220 Infinity II LC* di Laboratorium STIKes Mitra Keluarga.
2. Mengetahui kadar kafein dalam kopi bubuk dengan berbagai jenis

D. Manfaat Penelitian

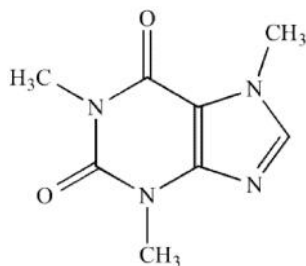
Hasil penelitian ini diharapkan memberikan manfaat untuk memperoleh suatu metode analisis kafein dalam kopi bubuk yang tervalidasi menggunakan KCKT. Hasil penelitian juga diharapkan dapat menambah kasanah ilmu pengetahuan serta berguna bagi bangsa dan negara.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1. Kafein

Kafein merupakan golongan xantin yang terkandung secara alamiah dalam tanaman dan digunakan dalam pengobatan. Senyawa kafein merupakan salah satu golongan alkaloid metilxantin. Kafein memiliki efek menstimulasi sistem saraf pusat (SSP), meningkatkan kesadaran, melemaskan otot halus, menstimulasi otot jantung, meningkatkan diuresis, mengobati sakit kepala (Anonim, 2018).



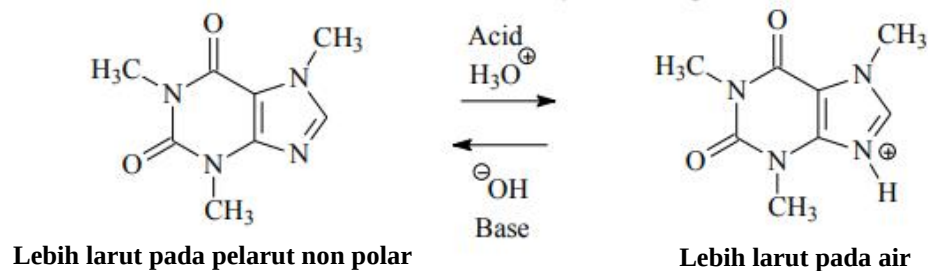
Gambar 1. Struktur Molekul Kafein (C₈H₁₀N₄O₂)

Kafein berupa kristal berwarna putih, menyublim pada suhu 178 °C, titik lebur 238 °C. Adanya basa kuat, kafein akan terdekomposisi. Mudah larut dalam pyrole, tetrahydrofuran yang mengandung 4% air, larut dalam etil asetat, air pada perbandingan 1:46 dan 1:5,5 air pada suhu 80°C, 1:1,5 pada air mendidih, alkohol 1: 66 dan 1:22 pada alkohol suhu 60°C, aseton (1:50), kloroform (1:5,5), eter (1:530), benzene (1:100), sedikit larut pada petroleum eter. Kelarutan pada air akan meningkat dengan adanya alkali benzoate, sinamat, salisilat. Memiliki pKa 10,4 (40oC), 14,0 (25oC). Memiliki nilai Log P (octanol/water) 0,07

2. Metode Analisa Kafein

Kafein merupakan salah satu contoh alkaloid yang terkandung dalam tanaman. Alkaloid memiliki atom nitrogen yang bertanggungjawab terhadap sifat basa dari

alkaloid. Kebasaan nitrogen pada kafein dapat digunakan untuk meningkatkan dan menurunkan kelarutannya dalam air. Pada suasana asam akan merubah kafein menjadi garam asam konjugat dan menjadikannya lebih larut dalam air dalam bentuk kation. Pada suasana basa kafein tetap pada struktur alamiahnya dan menjadikannya kurang larut dalam air dibandingkan dalam suasana asam.



Gambar 2. Pengaruh suasana asam dan basa terhadap kelarutan kafein dalam air

Metode analisa kafein dari sampel produk kopi berdasarkan regulasi DIN ISO 20481 menggunakan KCKT Agilent 1260 Infinity LC System, software Agilent OpenLAB CDC Chem Station, fase gerak methanol : air (75:25), kolom C18 Agilent ZORBAX Eclips Plus 4,6 x 150 mm 5 μm , kecepatan fase gerak 1 mL/min didapatkan kafein pada waktu retensi 6,8 menit (Naegele, 2016).

3. Validasi Metode Analisa

Hasil dari setiap analisis kuantitatif harus memenuhi keabsahan atau validitas, untuk mencapai hal itu maka perlu dilakukan validasi terhadap metode analisis yang dilakukan. Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penelitian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Anonim, 2009). Tujuan utamanya adalah untuk menjamin bahwa metode analisis yang akan digunakan mampu memberikan hasil yang cermat dan dapat diandalkan. Suatu metode dikatakan memenuhi persyaratan validasi apabila hasilnya memenuhi persyaratan parameter-parameter yang akan diujikan. Parameter-

parameter yang diuji dalam validasi metode ini meliputi spesifisitas (*specificity*), linieritas (*linearity*), rentang (*range*), batas deteksi/*Limit of Detection* (LOD) dan batas kuantitasi/*Limit of Quantitation* (LOQ), ketepatan (*accuracy*), dan ketelitian (*precision*) (Anonim, 2005).

a. Selektivitas dan spesifisitas

Selektivitas adalah ukuran kemampuan suatu metode untuk dapat mendeterminasi suatu senyawa dalam matrik tanpa adanya gangguan dari komponen matrik sehingga dapat dibedakan dari komponen matrik lainnya. Spesifisitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk hanya mendeterminasi analit secara spesifik tanpa adanya interferensi dari komponen matrik (Enein, 2000). Selektivitas yang meyakinkan merupakan langkah awal dalam pengembangan dan validasi suatu metode yang baik.

Tujuan dalam kromatografi adalah pemisahan komponen-komponen dalam campuran, sehingga diperlukan suatu ukuran tingkat pemisahan. Parameter yang digunakan adalah resolusi puncak (R_s), yaitu jarak pemisahan dua puncak dibagi rata-rata lebar dasar kedua puncak tersebut.

$$R_s = \frac{1,18 (t_2 - t_1)}{W_{0,5(1)} + W_{0,5(2)}}$$

Keterangan :

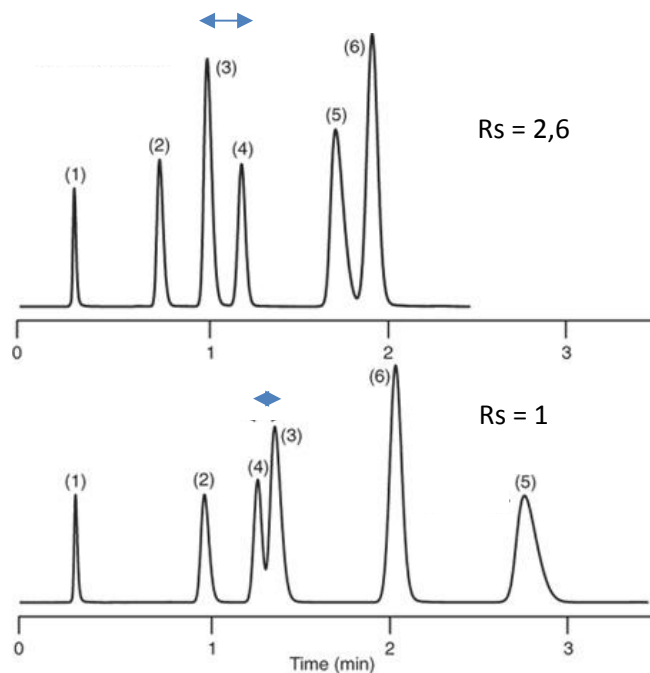
R_s = resolusi

t_1 = waktu tambat (menit) puncak 1

t_2 = waktu tambat (menit) puncak 2

$W_{0,5(1)}$ = lebar puncak pada setengah tinggi puncak 1

$W_{0,5(2)}$ = lebar puncak pada setengah tinggi puncak 2



Gambar 5 Hubungan R_s dengan pemisahan pada senyawa (3) dan (4) dengan pengaruh perubahan komposisi fase gerak (Snyder *et al.*, 1997)

Nilai R_s 1,0 menunjukkan puncak-puncak tersebut tidak terpisah sampai *baseline*, sedang nilai R_s 2,6 menunjukkan puncak-puncak telah terpisah sampai *baseline*. Dalam pengembangan metode, nilai $R_s \geq 2$ menunjukkan pemisahan antara dua puncak baik (Snyder *et al.*, 1997). Ilustrasi kromatogram yang menunjukkan hubungan R_s dengan pemisahan diterangkan pada gambar 5.

b. Linieritas dan rentang

Linieritas merupakan ukuran kemampuan suatu metode dalam menghubungkan respon dengan kadar analit pada suatu kurva kalibrasi sehingga membentuk garis lurus (Ahuja dan Dong, 2005). Perhitungan linieritas dilakukan dengan menghitung kadar analit pada minimal 5 seri konsentrasi (Anonim, 2005). Data yang diperoleh kemudian diolah melalui regresi linier dengan persamaan sebagai berikut:

$$y = mx + b$$

keterangan:

y = respon

x = konsentrasi

m = *slope*

b = *intercept*

(Snyder *et al.*, 1997)

Persyaratan data linieritas dan nilai koefisien korelasi (r) yang dapat diterima untuk masing-masing uji memiliki nilai yang berbeda-beda, hal ini ditunjukkan pada tabel II.

Tabel I. Level, Rentang dan Kriteria Penerimaan dalam Determinasi Linieritas

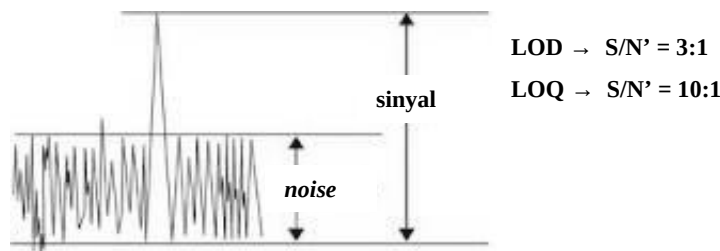
Pengujian	Level	Rentang	Kriteria yang diterima
<i>Assay</i>	5	50-150%	$R \geq 0,999$, $y\text{-intercept} \leq 2,0\%$
<i>Dissolution</i>	5-6	10-150%	$R \geq 0,99$, $y\text{-intercept} \leq 5,0\%$
<i>Impurity</i>	5	LOQ-2%	$R \geq 0,98$
<i>Cleaning</i>	5	LOQ-20 x LOD	$R \geq 0,98$

(Ahuja dan Dong, 2005)

Rentang metode adalah pernyataan batas konsentrasi terendah dan tertinggi analit dari suatu metode yang telah memenuhi ketepatan, ketelitian dan linieritas (Harmita, 2004).

c. Batas Deteksi/*Limit of Detection* (LOD) dan Batas Kuantitasi/*Limit Of Quantitation* (LOQ)

Batas deteksi menggambarkan konsentrasi analit terkecil dalam sampel yang dapat memberikan respon yang berbeda signifikan dibandingkan respon blangko (Harmita, 2004). Batas deteksi berhubungan dengan sinyal dan *noise* pada kromatogram yang memiliki perbandingan sinyal dan *noise* (S/N') sebesar 3:1. Batas kuantitasi adalah konsentrasi terkecil analit yang dapat diukur serta memenuhi ketepatan dan ketelitian (Snyder *et al.*, 1997). Batas kuantitasi memiliki perbandingan S/N' sebesar 10:1. Gambar 6 menunjukkan perbandingan *noise* dan sinyal.



Gambar 6 Perbandingan sinyal dan noise (S/N') untuk menentukan LOD dan LOQ dari suatu metode

Batas kuantitasi dapat ditentukan dengan tiga cara, yang pertama adalah dengan menghitung perbandingan S/N' memiliki nilai 10:1 seperti yang ditunjukkan pada gambar 6, cara kedua dengan menetapkan beberapa tingkat ketelitian dan menentukan secara eksperimental luas puncak yang diperlukan untuk tingkat ketelitian tersebut, dan yang ketiga adalah dengan distribusi Gaussian (Snyder *et al.*, 1997).

d. Ketepatan (*accuracy*)

Akurasi atau ketepatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya (Harmita, 2004). Penentuan akurasi metode analisis dinyatakan dengan persen perolehan kembali atau % *recovery* terhadap sampel yang kadarnya telah diketahui dengan pasti. Ketepatan hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Ketepatan yang tinggi dapat dicapai dengan mengurangi galat sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang dapat melarutkan senyawa dengan sempurna, pengontrolan suhu, pelaksanaan yang cermat, dan taat asas sesuai prosedur (Harmita, 2004).

Akurasi yang dinyatakan dengan uji *recovery* dapat dilakukan melalui 3 cara, yaitu metode menempatkan analit dalam placebo (*spike placebo recovery*), membandingkan analit dengan senyawa baku (*comparison to a standard*), dan penambahan baku (*standard addition method*) (Snyder *et al.*, 1997). Dalam metode *spike placebo recovery*, sejumlah analit murni (senyawa baku) ditambahkan ke dalam placebo, selanjutnya campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan.

Metode membandingkan analit dengan senyawa baku dilakukan dengan pengujian secara paralel atas sampel menggunakan metode analisis yang sedang dievaluasi dan metode analisis lain yang telah diakui secara internasional sebagai metode baku. Metode dikatakan tepat jika menghasilkan data yang tidak berbeda signifikan dengan data yang diperoleh menggunakan metode baku.

Metode penambahan baku dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit yang diketahui jumlahnya ke dalam sampel matriks yang telah mengandung analit yang sudah ditetapkan kadarnya. Konsentrasi analit dalam sampel dianalisis dan dapat dihitung secara matematik. Metode ini digunakan untuk matriks sampel yang sulit untuk dibuat plasebo. Kriteria akurasi yang masih dapat diterima pada konsentrasi tertentu analit dapat dilihat pada tabel III.

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{kadar baku yang diperoleh}}{\text{kadar baku yang ditambahkan}} \times 100\% \quad (8)$$

e. Ketelitian (*precision*)

Presisi atau ketelitian adalah kemampuan suatu metode untuk menghasilkan data yang menunjukkan kesesuaian hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang (*reproducible*) (Ahuja dan Dong, 2005). Makin kecil nilai simpangan relatif atau simpangan baku yang dihasilkan suatu metode, maka ketelitian metode tersebut makin tinggi. Ketelitian suatu metode menurut *International Conference on Harmonization* (ICH) dibagi menjadi 3 tipe, yaitu keterulangan (*repeatability*), *intermediate precision*, dan ketertiruan (*reproducibility*).

Keterulangan merupakan ukuran kemampuan suatu metode untuk menghasilkan nilai yang hampir sama dari beberapa pengukuran sampel. Uji dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi yang sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dapat dilakukan dengan membuat 6 replikasi dengan kadar yang sama atau dengan tiga replikasi dengan tiga tingkat konsentrasi yang berbeda (Anonim, 2005). Hal ini dapat mengevaluasi besarnya variasi yang dapat terjadi dari analis dan sistem KCKT dalam menganalisis sampel.

Ukuran kemampuan lainnya adalah *intermediate precision*, yaitu ukuran kemampuan suatu metode untuk menghasilkan nilai yang hampir sama yang dilakukan oleh analis, peralatan, dan hari yang berbeda pada laboratorium yang sama. Pengujian ini mengukur variasi yang dapat terjadi dalam suatu laboratorium. *Intermediate precision* tidak wajib dilakukan dalam uji ketelitian dan dapat digantikan oleh uji ketertiruan (*reproducibility*) yang merupakan ukuran kemampuan suatu metode untuk dilaksanakan di laboratorium lain. Kriteria presisi yang masih dapat diterima pada konsentrasi tertentu analit dapat dilihat pada tabel III.

Tabel II Kriteria Akurasi dan Presisi yang Masih Dapat Diterima pada Perbedaan Konsentrasi Analit dalam AOAC sebagaimana Disitasi oleh Gonzalez dan Herrador

Konsentrasi Analit (%)	Unit	Akurasi (% <i>recovery</i>)	Presisi (% CV)
100	100%	98-102	1,3
≥10	10%	98-102	2,7
≥1	1%	97-103	2,8
≥0,1	0,1%	95-105	3,7
0,01	100 ppm	90-107	5,3
0,001	10 ppm	80-110	7,3
0,0001	1 ppm	80-110	11
0,00001	100 ppb	80-110	15
0,000001	10 ppb	60-115	21
0,0000001	1 ppb	40-120	30

(AOAC dalam Gonzalez dan Herrador, 2007)

Terdapat 4 kategori metode pengujian menurut *United State Pharmacopeia* (USP). Setiap metode uji yang berbeda membutuhkan validasi yang berbeda pula seperti terlihat dalam tabel IV. Keempat kategori metode pengujian dengan validasi metode yang diperlukan adalah sebagai berikut:

a. Kategori I

Metode analisis yang digunakan untuk kuantitasi komponen utama dalam bahan baku atau bahan aktif (termasuk pengawet) dalam produk jadi.

b. Kategori II

Metode analisis yang digunakan untuk menetapkan ketidakmurnian dalam bahan baku dan senyawa hasil degradasi dalam produk jadi, serta verifikasi proses pembersihan. Metode ini mencakup analisis kuantitatif dan uji batas.

c. Kategori III

Metode analisis yang digunakan untuk menetapkan performa dari karakteristik sampel, seperti disolusi dan pelepasan obat. Ketelitian merupakan satu-satunya parameter yang dibutuhkan dalam kategori ini.

d. Kategori IV

Uji identifikasi merupakan uji yang termasuk dalam kategori ini. Uji identifikasi ditujukan untuk memastikan identitas dari suatu analit dalam sampel. Parameter yang dibutuhkan untuk validasi hanyalah selektivitas saja. Identifikasi menggunakan KCKT dapat dilakukan dengan membandingkan waktu tambat (t_R) atau waktu tambat relatif dari sampel dengan t_R dari baku, selain itu dapat dengan membandingkan spektra UV sampel dan baku apabila menggunakan detektor UV-PDA (Ahuja dan Dong, 2005; Anonim 2009).

Tabel III Elemen Data yang Dibutuhkan untuk Validasi Metode Analisis

Karakteristik Performa Analisis	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Kuantitatif	Uji batas		
Ketepatan	Ya	Ya	*	*	Tidak
Ketelitian	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak
Selektivitas	Ya	Ya	Ya	*	Ya
Batas deteksi	Tidak	Tidak	Ya	*	Tidak
Batas Kuantitasi	Tidak	Ya	Tidak	*	Tidak
Linieritas	Ya	Ya	Tidak	*	Tidak
Rentang	Ya	Ya	*	*	Tidak

Keterangan: * Mungkin dibutuhkan, tergantung dari masing-masing uji.

(Anonim, 2009)

4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi merupakan prosedur pemisahan senyawa campuran berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi karena adanya perbedaan koefisien distribusi masing-masing senyawa di antara dua fase yang saling bersinggungan dan tidak saling campur, yang disebut fase gerak (mobile phase) yang berupa zat cair atau zat gas, dan fase diam (stationary phase) yang berupa zat cair atau zat padat (Snyder, 1997)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan salah satu metode kromatografi cair yang fase geraknya dialirkan secara cepat dengan bantuan tekanan, dan hasilnya dideteksi dengan instrument (Kromidas, 2000). KCKT merupakan teknik analisis yang paling

sering digunakan dalam analisis farmasi untuk pemisahan, identifikasi, dan determinasi dalam campuran yang kompleks.

Terdapat tiga variable utama pada sistem KCKT yaitu fase gerak, fase diam dan detector. Fase gerak pada KCKT sangat berpengaruh pada tambatan dan pemisahan senyawa. Fase gerak untuk analisis secara KCKT harus bersifat murni, tanpa cemaran, tidak bereaksi dengan kemasan, dapat melarutkan solute, viskositas rendah memungkinkan memperoleh cuplikan kembali dengan mudah (Johnson dan Stevenson, 1978). Kepolaran pelarut merupakan ukuran kekuatan pelarut untuk mengelusi suatu senyawa. Kandungan utama fase gerak pada kromatografi fase terbalik adalah air. Kecenderungan air untuk melarutkan sampel dapat diubah dengan menambahkan garam, asam, basa, dapar, pengompleks dan campuran dengan fase organik. Fase gerak organik yang banyak digunakan adalah methanol, asetonitril dan tetrahidrofuran (Munson, 1984).

Keberhasilan pemisahan komponen sampel bergantung pada interaksi sampel dengan kolom. Kolom dapat dibagi menjadi dua macam yaitu kolom analitik dan kolom preparative. Kolom analitik memiliki diameter pada bagian dalam 2-6 mm. Panjang kolomnya bergantung pada jenis kemasan yaitu antara 50-100 cm dan 10-30 cm. Kolom preparatif memiliki diameter 6 mm atau lebih dan panjang kolom 25-100 cm (Johnson dan Stevenson, 1978). Detektor yang baik memiliki kepekaan tinggi, rentang respon liniernya lebar, tidak dipengaruhi perubahan suhu dan aliran, memberikan hasil dengan keterulangan yang baik. Contoh detector yang sering digunakan adalah fluoresensi, penyerapan (UV-Vis), dan elektrokimia (Munson, 1984).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. JENIS PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen yang dilakukan di laboratorium STIKes Mitra Keluarga.

B. ALAT

Seperangkat alat KCKT Agilent Technologies 1220 Infinity II LC yang dilengkapi dengan detektor UV-Vis, *sample injector*, pompa *rocker*, *Agilent Lab Advisor Basic Software* untuk pengoperasian KCKT, kolom analisis ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6x150 mm, 5 μ m), membran filter (*Econofltr PTFE 13m*) 0,45 μ m, spektrofotometer, kertas saring, timbangan analitik, oven Memmert, botol vial, mikro pipet, pipet volum, sonikator, serta alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis.

C. BAHAN

Sampel yang digunakan adalah kopi instan, baku pembanding kafein, metanol berderajat KCKT, akuabidest steril (Ikapharmindo Putramas, Indonesia), zink oksida.

D. CARA KERJA

1. Pembuatan Larutan Baku Pembanding (200 mg/L)

Sebanyak 200 mg standar kafein dilarutkan dalam 500 mL aquadest hangat pada labu ukur 1 L. Setelah larutan dingin ditambahkan aquadest hingga tanda batas.

2. Penyiapan Sampel

Kopi instan sebanyak 0,5 gram yang ditambah 5 gram ZnO dilarutkan dalam 200 mL aquadest pada suhu 90°C. Larutan diaduk selama 20 menit pada suhu 90°C dalam waterbath. Larutan dikeluarkan dari waterbath dan dibiarkan dingin. Larutan kemudian disaring menggunakan *cellulose syringe filter*. Filtrat diencerkan 10 kali.

3. Kondisi Operasional KCKT

a. Verifikasi panjang gelombang

Larutan baku kafein sejumlah 1 ml yang telah disaring menggunakan membran filter *Phenex NY* 0,45 μm dilakukan *scanning* panjang gelombang maksimum menggunakan alat spektrofotometer. Panjang gelombang yang dipilih sebagai panjang gelombang detektor adalah yang dapat memberikan nilai tertinggi.

b. Verifikasi komposisi fase gerak

Komposisi campuran fase gerak yang digunakan methanol : aquabidest (25:75). Sejumlah 20 μL larutan baku kafein diinjeksikan ke sistem KCKT untuk kemudian dilihat waktu tambat, dan resolusi puncak yang dihasilkan dari kromatogram. Verifikasi fase gerak dengan syarat nilai $R_s \geq 2$ dengan waktu tambat yang tidak lebih dari 10 menit.

c. Optimasi kecepatan alir

Larutan baku kafein diambil sejumlah 20 μL diinjeksikan ke sistem KCKT sebanyak lima replikasi dengan fase gerak hasil verifikasi. Verifikasi kecepatan alir dilakukan dengan mencoba kecepatan 0,5; 0,8; 1,0 mL/min. Waktu tambat, luas puncak dan tinggi puncak yang tampak pada kromatogram diamati untuk kemudian dihitung lempeng teoritis (N) dan nilai HETP (H). Kecepatan alir optimum dipilih saat nilai H terkecil dan pada saat nilai N terbesar (Snyder *et al.*, 1997).

d. Verifikasi pompa

Larutan baku kafein sejumlah 20 μL dengan konsentrasi 25 ppm diinjeksikan ke sistem KCKT dengan λ_{max} 273 nm. Kecepatan alir pompa diatur sebesar 5, 1 dan 0,5 mL/min dengan fase gerak metanol. Metanol yang melewati sistem HPLC ditampung menggunakan labu takar 25 mL untuk kecepatan alir 5 mL/min dan menggunakan labu takar 10 mL untuk kecepatan lair 1 dan 0,5 mL/min. Diukur waktu yang dibutuhkan methanol dengan berbagai waktu alir untuk memenuhi labu takar dengan *stopwatch*.

Akurasi pompa dinyatakan melalui nilai penyimpangan kecepatan alir terukur dari kecepatan alir yang diharapkan. Nilai penyimpangan yang dapat diterima adalah $\pm 2\%$ (Lam, 2004). Presisi pompa ditunjukkan melalui kekonstanan jangka panjang

dan kekonstanan jangka pendek. Kekonstanan jangka panjang dilakukan dengan menghitung nilai simpangan baku relatif (RSD) waktu tambat, sedangkan kekonstanan jangka pendek dilakukan dengan menghitung RSD luas area dan tinggi puncak (Kromidas, 2000; Snyder *et al.* , 1997). Nilai RSD waktu tambat 0,2-0,5% dan luas area < 15% untuk *trace analysis*, menunjukkan presisi pompa yang baik (Kromidas, 2000).

e. Verifikasi detector

Larutan baku kafein diencerkan dengan aquadest hingga diperoleh larutan kafein dengan variasi konsentrasi 1,25; 2,5; 5; 10; 20 mg/L. Masing-masing konsentrasi dibuat tiga kali replikasi dan diinjeksikan 20 μ L ke sistem KCKT dengan fase gerak, kecepatan alir dan $\lambda_{\max}$ hasil optimasi. Ditentukan linieritas detektor berdasarkan kadar vs tinggi puncak. Nilai koefisien korelasi (r) $\geq 0,98$ menunjukkan bahwa detektor memiliki linieritas yang cukup baik (Ahuja dan Dong, 2005).

f. Verifikasi sistem injeksi

Larutan baku kafein dengan konsentrasi 10 mg/L diinjeksikan sejumlah 20 μ L ke sistem KCKT sebanyak enam replikasi. Fase gerak, kecepatan alir dan $\lambda_{\max}$ yang digunakan merupakan hasil optimasi. Nilai RSD tinggi puncak kafein mewakili presisi sistem injeksi yang digunakan. Nilai RSD tinggi puncak $\leq 15\%$ menunjukkan sistem injeksi pada alat KCKT cukup baik dan layak digunakan dalam validasi metode analisis (Kromidas, 2000).

g. Uji kesesuaian sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk menjamin sistem KCKT memberikan data yang dapat diterima pada komposisi fase gerak, kecepatan alir dan $\lambda_{\max}$ hasil optimasi. Larutan baku kafein dengan konsentrasi 10 mg/L diinjeksikan sejumlah 20 μ L ke alat KCKT sebanyak enam kali replikasi. Parameter yang digunakan untuk menentukan kriteria penerimaan uji kesesuaian sistem adalah lempeng teoritis (N), *asymmetry*, RSD tinggi puncak, dan luas area. Kondisi KCKT memberikan

kesesuaian sistem yang baik jika nilai $RSD \leq 2\%$ (Anonim, 2009; Snyder *et al.* , 1997).

4. Validasi metode

a. Selektivitas

Larutan baku kafein dengan konsentrasi 10 mg/L diinjeksikan sejumlah 20 μ L ke sistem KCKT dengan fase gerak, kecepatan alir dan $\lambda_{\max}$ yang telah ditetapkan sebelumnya. Penentuan selektivitas dari suatu metode dapat dilakukan dengan menghitung nilai resolusi (R_s) antara puncak kafein dan senyawa lain yang terdapat pada larutan sampel (Harmita, 2004). Resolusi merupakan nilai yang menunjukkan kualitas pemisahan dari dua senyawa. Pemisahan dua senyawa yang baik apabila nilai $R_s \geq 2$ (Snyder *et al.* , 1997).

b. Linieritas

Seri konsentrasi baku kafein dibuat dalam aquabidest dengan konsentrasi sebagai berikut 1,25; 2,5; 5; 10; 20 mg/L. Seri konsentrasi baku kafein kemudian diinjeksikan 20 μ L ke sistem KCKT. Dibuat 3 seri konsentrasi baku kafein untuk replikasi.

Regresi linear dibuat dengan membuat kurva hubungan antara konsentrasi kafein (sumbu X) dengan luas puncak kromatogram (sumbu Y). Hasil persamaan garis regresi linier yang diperoleh, dipilih salah satu persamaan dengan koefisien korelasi (r) terbaik, syarat r yang baik apabila $r \geq 0,999$ (Ahuja dan Dong, 2005).

c. Batas deteksi (LOD) dan Batas Kuantitas (LOQ)

Seri konsentrasi baku kafein dibuat dalam aquabidest dengan konsentrasi sebagai berikut 0,6; 0,125; 0,25; 0,5; 1 mg/L. Seri konsentrasi baku kafein kemudian diinjeksikan 20 μ L ke sistem KCKT. Sebanyak 20 μ L larutan sampel diinjeksikan untuk dihitung tinggi *noise*. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi

(LOQ) dilakukan berdasarkan SD respon blanko dengan menghitung nilai 3,3SD dan 10SD dari respon blanko.

d. Ketelitian (Presisi)

Sebanyak 3 seri konsentrasi larutan kafein yaitu 1,25; 5 dan 20 mg/L. Larutan kafein diinjeksikan 20 μ L ke sistem KCKT dengan fase gerak, kecepatan alir dan $\lambda_{\max}$ yang telah ditetapkan sebanyak 3 replikasi. Diperoleh data waktu tambat, luas area dan tinggi puncak untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian harga RSD dihitung untuk konsentrasi, waktu tambat, luas area dan tinggi puncak kromatogram.

e. Akurasi

Metode yang digunakan untuk uji *recovery* dalam penelitian yang akan dilakukan ini adalah metode *spiked placebo recovery*. Dalam tiap matrik placebo berupa larutan yang mengandung kafein ditambahkan baku kafein dengan 3 tingkat konsentrasi berbeda dan masing-masing dianalisis 3 replikasi. Konsentrasi yang digunakan adalah 1,25; 5 dan 20 mg/L. Sampel yang telah disaring menggunakan membran filter 0,45 μ m kemudian diinjeksikan 20 μ L ke sistem KCKT dengan fase gerak, kecepatan alir dan $\lambda_{\max}$ yang telah ditetapkan. Kadar kafein yang diperoleh dari hasil analisis kemudian dibandingkan dengan kadar kafein yang ditambahkan sehingga didapatkan nilai % *recovery*.

5. Aplikasi metode analisis kafein dalam kopi instan

Larutan kopi instan disaring dengan membran filter 0,45 μ m. Sebanyak 20 μ L larutan diinjeksikan ke sistem KCKT dengan komposisi dan kecepatan alir fase gerak serta $\lambda_{\max}$ hasil optimasi. Metode yang telah diuji validitasnya digunakan untuk menganalisis kafein yang terkandung dalam sampel. Masing-masing sampel dianalisis sebanyak 3 replikasi.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Verifikasi Pompa

Akurasi

Stopwatch yang digunakan dalam pengukuran waktu memiliki model Q&Q dengan nomor seri CR2032 dengan batas kalibrasi ulang hingga 19 Juli 2019. Labu takar 10 dan 25 mL yang digunakan memiliki model IWAKI dengan batas kalibrasi ulang hingga 14 Agustus 2019. Adapun hasil dari verifikasi akurasi pompa dapat dilihat pada tabel IV. Akurasi pompa dinyatakan melalui nilai penyimpangan kecepatan alir terukur dari kecepatan alir yang diharapkan. Nilai penyimpangan yang dihasilkan adalah < dari 2% sehingga dapat disimpulkan bahwa pompa memiliki akurasi yang baik.

Tabel IV. Hasil verifikasi akurasi pompa

Kecepatan alir (mL/min)	Volume (mL)	Hasil (menit:detik)	Hasil (menit)	Waktu teoritis (menit)	% Deviasi	Persyaratan	Kesimpulan
0,5	10	19:54	19,900	20	0,5	±2%	Sesuai
1	10	09:56	9,933	10	0,7	±2%	Sesuai
5	25	05:00	5,000	5	0,0	±2%	Sesuai

Presisi

Pada kecepatan alir 1 mL/min, $\lambda_{\max}$ 273 nm, jumlah injeksi 20 μ L kafein 25 ppm, fase gerak aquadest dan dilakukan sebanyak 6 replikasi, didapatkan data presisi seperti pada tabel V. Presisi pompa dinyatakan melalui kekonstanan jangka panjang dan jangka pendek. Nilai simpangan baku relatif (RSD) waktu tambat dijadikan parameter kekonstanan jangka panjang dan RSD luas area dijadikan parameter kekonstanan jangka pendek. Hasil verifikasi presisi pompa menunjukkan bahwa nilai RSD waktu tambat (R_t) adalah 0,5% memenuhi persyaratan 0,2-0,5% dan luas area adalah 0,04% memenuhi persyaratan < 15%. Dapat disimpulkan bahwa pompa memiliki presisi yang baik. Hasil akurasi dan presisi pompa yang baik menunjukkan bahwa pompa akan memberikan performa yang baik dan konsisten selama proses analisis.

Tabel V. Hasil verifikasi presisi pompa

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Rt (menit)	Luas area	Tinggi puncak (mAU)
Kafein	25	0,1	1329,7997	436,5485
Kafein	25	0,1	1331,0398	432,5464
Kafein	25	0,1	1330,7083	433,7319
Kafein	25	0,1	1331,5889	432,0427
Kafein	25	0,099	1330,5155	435,5100
Kafein	25	0,099	1330,6162	436,0391
	Rata-rata	0,1	1330,7114	434,4031
	SD	0,001	0,5927	1,8960
	RSD	0,5 %	0,0445%	0,4365%

B. Verifikasi komposisi fase gerak

Komposisi fase gerak yang digunakan adalah methanol : aquabidest (25:75). Pada verifikasi fase gerak diketahui bahwa waktuambat (Rt) yang dibutuhkan tidak lebih dari 10 menit yaitu rata-rata 6,173 menit dengan resolusi (Rs) ≥ 2 yaitu 19,579. Hal ini menunjukkan bahwa komposisi fase gerak yang digunakan memberikan hasil yang baik.

Tabel VI. Hasil verifikasi komposisi fase gerak

Replikasi	Rt	Rs
1	6,199	19,768
2	6,190	19,737
3	6,183	19,655
4	6,172	19,552
5	6,164	19,516
6	6,155	19,453
7	6,145	19,371
rata-rata	6,173	19,579
SD	0,019	0,147
RSD (%)	0,3	0,8

C. Optimasi kecepatan alir

Pemilihan kecepatan alir optimum didasarkan nilai N terbesar dan HETP terkecil yang ditunjukkan pada kecepatan 0,5 mL/min. Pada kecepatan tersebut memiliki kelemahan yaitu waktu tambat yang lebih dari 10 menit yaitu 11,672 menit. Hal ini membuat waktu analisis semakin lama dan kurang efektif. Waktu tambat tercepat ditunjukkan pada kecepatan alir 1 mL/min yaitu 6,084 menit dengan nilai N 9859,94 dan HETP 0,01521. Meskipun nilai N lebih kecil dan HETP pada kecepatan 1 mL/min lebih besar dibandingkan kecepatan 0,5 mL/min, namun nilai tersebut masih memenuhi persyaratan nilai yang baik yaitu $N > 5.000$. Berdasarkan analisa tersebut maka kecepatan optimum yang dipilih adalah 1 mL/min.

Tabel VII. Hasil optimasi kecepatan alir fase gerak

Kecepatan alir (mL/min)	Rt	Luas puncak	Tinggi puncak	N (jumlah lempeng teoritis)	HETP (mm)
0,5	11,672	1265,22	78,26	12054,06	0.01244
0,8	7,288	787,10	70,61	9872,06	0.01519
1	6,084	628,23	67,53	9859,94	0.01521

D. Uji Kesesuaian Sistem (SST)

Tabel VIII. Hasil Uji kesesuaian sistem

Replikasi	Rt	Luas area	Tinggi	N	<i>Asymmetry factor</i>
1	6,075	628,05	67,88	9935	1,05
2	6,079	627,88	67,98	9980	1,04
3	6,084	628,23	67,53	9860	1,03
4	6,089	627,52	68,58	10192	1,04
5	6,102	628,13	67,12	9803	1,03
6	6,121	628,53	66,76	9740	1,04
7	6,137	629,23	66,46	9697	1,03
rata-rata	6,098	628,22	67,47	9.887	1,04
SD	0,023	0,541	0,743	168,063	0,008
RSD (%)	0,4	0,1	1,1	1,7	0,7

Berdasarkan data diatas sistem yang digunakan pada komposisi fase gerak methanol : air (25:75), kecepatan alir 1 mL/min, panjang gelombang 273 nm memberikan hasil yang memenuhi persyaratan yaitu $RSD \leq 2\%$ pada waktu tambat, luas area dan tinggi puncak, memiliki nilai $N > 5.000$ yaitu 9.887, serta nilai *asymmetry factor* $< 1,5$ yaitu 1,04.

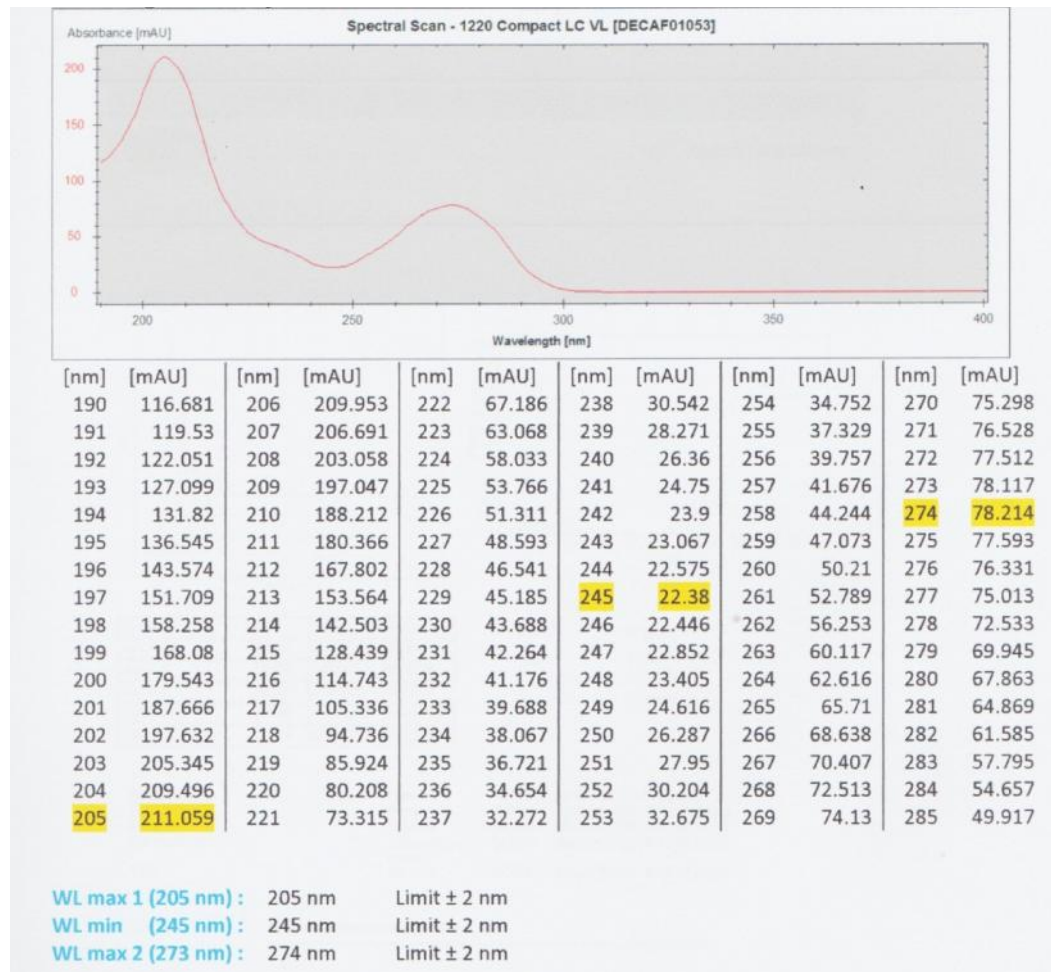
E. Validasi metode

Sistem pada HPLC yang digunakan untuk penetapan kadar kafein dalam kopi bubuk adalah sebagai berikut:

Kolom	: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6x150 mm, 5 μ m)
Fase gerak	: campuran methanol : aquabidest (25:75 v/v)
Pelarut	: akuabides
Kecepatan alir	: 1 mL/menit
Detektor	: UV λ 273 nm
Volume injeksi	: 20 μ L
Waktu analisis	: 10 menit
Sampel	: kopi bubuk yang diseduh dengan air panas 90°C

1. Spesifisitas

Didapatkan panjang gelombang maksimum yaitu pada 205 dan 274 nm. Puncak tertinggi adalah pada puncak 205 nm, namun pada panjang gelombang tersebut dapat terjadi overlapping dari pelarut methanol yang memiliki panjang gelombang maksimum 205 nm. Panjang gelombang yang dipilih dalam penelitian ini adalah 273 nm sesuai dengan teori dan berdasarkan data scanning didapatkan nilai mendekati yaitu 274 nm.



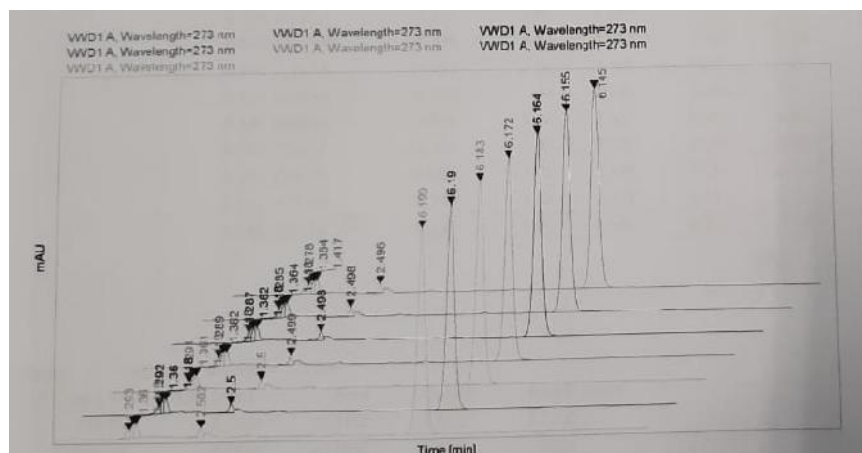
Gambar 7. Optimasi panjang gelombang maksimum kafein

2. Selektivitas

Selektivitas ditentukan dengan menginjeksikan sampel pada sistem kromatografi. Puncak yang muncul tidak boleh terpengaruh oleh puncak yang lain. Pada sampel kafein diketahui memiliki nilai resolusi 19,579 yang memenuhi syarat yaitu $R_s \geq 2$.

Tabel IX. Hasil Uji kesesuaian sistem

Replikasi	Rt	Rs
1	6,199	19,768
2	6,190	19,737
3	6,183	19,655
4	6,172	19,552
5	6,164	19,516
6	6,155	19,453
7	6,145	19,371
rata-rata	6,173	19,579
SD	0,019	0,147
RSD (%)	0,3	0,8



Tabel X. Hasil luas area dan waktu retensi dari seri baku kafein

Konsentrasi. (ppm)	Luas Area			Waktu Retensi		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
1.2	205.1	204.9	205.1	5.688	5.722	5.733
2.5	404.3	404.6	404.3	5.775	5.763	5.752
5	828.6	828.8	828.8	5.741	5.732	5.723
10	1609.9	1610.5	1612	5.718	5.713	5.736
20	3250.2	3246.9	3248	5.729	5.729	5.727

Tabel XI. Hasil nilai korelasi (r) luas area kromatogram dan konsentrasi kafein

Replikasi	Persamaan Garis	R ²	r
1	Y = 161.9 X + 6.239	0.999	0,9995
2	Y = 161.7 X + 7.084	0.999	0,9995
3	Y = 161.8 X + 7.015	0.999	0,9995

4. Presisi

Berdasarkan dari hasil pengujian keterulangan (*repeatability*) yang dapat dilihat pada tabel XII, menunjukkan bahwa pada setiap konsentrasi memiliki nilai RSD < 2%. Hal ini menunjukkan bahwa hasil uji presisi metode analisis yang digunakan memenuhi persyaratan presisi.

Tabel XII. Hasil uji keterulangan (*repeatability*)

	1	2	3	rata-rata	SD	RSD
1.2 ppm						
RT	5.688	5.722	5.733	5.714333	0.023459	0.41%
Area	205.1	204.9	205.1	205.0333	0.11547	0.06%
5 ppm						
RT	5.741	5.732	5.723	5.732	0.009	0.16%
Area	828.6	828.8	828.8	828.7333	0.11547	0.01%
20 ppm						
RT	5.729	5.729	5.727	5.728333	0.001155	0.02%
Area	3250.2	3246.9	3248	3248.367	1.680278	0.05%

5. Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (% *recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Digunakan 3 konsentrasi kafein mewakili kadar rendah, tengah dan tinggi yaitu 1,2, 5 dan 10 ppm masing-masing 3 replikasi. Metode *standard addition* digunakan dalam penentuan % *recovery*. Hasil uji akurasi penetapan kadar kafein dalam kopi bubuk secara KCKT dapat dilihat pada tabel XIII.

Kriteria ketepatan tergantung pada konsentrasi analit dalam matriks sampel dan pada ketelitian metode (RSD) (Harmita, 2004). Konsentrasi analit 1-10 ppm memiliki syarat penerimaan % *recovery* 80-110% (AOAC dalam Gonzalez dan Herrador, 2007). Hasil percobaan menunjukkan bahwa % *recovery* yang diperoleh berada dalam rentang 80-110%. Hasil uji akurasi menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi syarat akurasi.

Tabel XIII. Hasil uji akurasi (% *recovery*)

Persamaan garis : $Y = 161.9 X + 6.239$					
Sampel	Replikasi			rata-rata	% <i>recovery</i>
	1	2	3		
Kopi	2.947	2.946	2.946	2.946	
Kopi + 1.2 ppm standar kafein	4.225	4.228	4.227	4.227	107%
Kopi + 5 ppm standar kafein	8.222	8.225	8.213	8.220	105%
Kopi + 10 ppm standar kafein	13.279	13.267	13.270	13.272	103%

F. Penetapan Kadar Kafein dalam Sampel Kopi bubuk jenis Brazilian, Java dan Sumatera Mandeling

Hasil validasi metode menunjukkan bahwa metode yang dikembangkan pada penelitian ini telah memenuhi persyaratan selektivitas, linieritas, presisi dan akurasi sehingga metode KCKT ini dapat digunakan untuk penetapan kadar kafein dalam kopi bubuk. Berdasarkan hasil percobaan didapatkan kadar kafein pada kopi jenis Brazilian, Java dan Sumatera Mandeling adalah berturut-turut 0,48; 0,53; dan 0,59 % (b/b)

Tabel XIV. Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk

Persamaan garis $Y = 162.7X + 7.142$						
Jenis Kopi	Replikasi			rata-rata	X	Konsentrasi (% b/b)
	1	2	3			
Brazilian	394.3	394.4	394.5	394.4	2.38	0.48
Java	436.8	436.6	437.4	436.9	2.64	0.53
Sumatera Mandeling	483.3	483.2	483.2	483.2	2.93	0.59

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Metode analisa dengan metode KCKT memenuhi persyaratan validasi
2. Kadar kafein pada kopi bubuk jenis Brazilian, Java dan Sumatera Mandeling adalah berturut-turut 0,48; 0,53; dan 0,59 % (b/b)

B. Kendala Penelitian

1. Pembagian waktu antara kegiatan tridharma
2. Kerusakan pada salah satu komponen pendukung HPLC
3. Kondisi kehamilan

C. Saran

Terdapat beberapa saran yang diusulkan untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dengan melengkapi penelitian sebagai berikut:

1. Melanjutkan penelitian dengan menetapkan kadar kafein dalam sampel kopi jenis lainnya
2. Membandingkan penetapan kadar kafein antara metode KCKT dengan metode lainnya

BAB VI

DAFTAR PUSTAKA

- Ahuja, S. and Dong, M.W., 2005, *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, vol. 6, Elsevier Academic Press. hal. 196, 201, 203.
- Anonim, 2005, *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), hal. 1-13.
- Anonim, 2009, *United State Pharmacopeia*, XXXII Edition, Rockville, United States of America, hal. 227, 733
- Anonim, 2018, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeine#section=Top>, diakses tanggal 17 Desember 2018
- AOAC dalam Gonzalez, A. G., Herrador, M. A., 2007, A Practical Guide to Analytical Method Validation, including Measurement Uncertainty and Accuracy Profiles, *Trends in Analytical Chemistry*, **26** (3), 232.
- Enein, H.Y.A., 2000, Selectivity Versus Specificity in Chromatographic Analytical methods, *Accredit. Qual. Assur.*, **5**, 180-181, Springer-Verlag
- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Departemen Farmasi FMIPA, Universitas Indonesia, Jakarta, **1** (3), 117-134.
- Jennifer L. Temple, 2018, Review: Trends, Safety, and Recommendations for Caffeine Use in Children and Adolescents, *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, vol 58, Issue 2, 36-45
- Johnson, E.L., dan Stevenson, R., 1978, *Basic Liquid Chromatography*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB Bandung.
- Kromidas, S., 2000, *Practical Problem Solving in HPLC*, Wiley-VCH, Weinheim, hal 36-40.

- Lam, H., 2004, Performance Verification of HPLC, dalam Chan, C.C., Lam, H., Lee, Y.C., and Zang, X., *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, hal. 173-182.
- Mejia, E.G. de, & Ramirez-Mares, M.V., 2014, Impact of Caffeine and Coffee on Our health. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(10), 489-492
- Munson, J.W., 1984, *Pharmaceutical Analysis Modern Methods*, diterjemahkan oleh Harjana Parwa B, Airlangga University Press, Surabaya.
- Naegele, Edgar, 2016, *Determination of Caffeine in Coffee Products according to DIN 20481*, Agilent Technology.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L., 1997, *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., John Willey & Sons, Inc., New York. hal. 25, 653, 644, 668, 685, 688, 705-706.