

**ANALISIS KADAR KAFEIN PADA COKLAT BATANG
DAN COKLAT PERMEN HASIL PRODUKSI INDUSTRI
RUMAHAN KAMPUNG COKLAT DENGAN METODE
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

SKRIPSI



VONY INTAN PRASASTY

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
STIKES KARYA PUTRA BANGSA
TULUNGAGUNG**

JULI 2019

**ANALISIS KADAR KAFEIN PADA COKLAT BATANG
DAN COKLAT PERMEN HASIL PRODUKSI INDUSTRI
RUMAHAN KAMPUNG COKLAT DENGAN METODE
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi
(S.Farm.)

Program Studi S-1 Farmasi

STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung



VONY INTAN PRASASTY

1513206009

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
STIKES KARYA PUTRA BANGSA
TULUNGAGUNG
JULI 2019**

SKRIPSI

**ANALISIS KADAR KAFEIN PADA COKLAT BATANG
DAN COKLAT PERMEN HASIL PRODUKSI INDUSTRI
RUMAHAN KAMPUNG COKLAT DENGAN METODE
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

Yang diajukan oleh:

VONY INTAN PRASASTY

1513206009

Telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



Afidatul Muadifah, M.Si
NIDN : 07 080391 02



Dhanang Prawira N, S. Farm., Apt
NP : 15.87.01.02

SKRIPSI

**ANALISIS KADAR KAFEIN PADA COKLAT BATANG
DAN COKLAT PERMEN HASIL PRODUKSI INDUSTRI
RUMAHAN KAMPUNG COKLAT DENGAN METODE
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

Oleh:

VONY INTAN PRASASTY

1513206009

Telah lolos uji etik penelitian dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi S1 Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa

Tanggal : 15 Juli 2019

Ketua penguji : Afidatul Muadhifah, S.Si., M.Si. (

Anggota penguji : 1. Dhanang Prawira N., S.Farm., Apt. (

2. Ana Amalia, M.Farm., Apt. (

3. Rahma Diyan Martha, S.Si., M.Sc. (



Mengetahui
STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung

Ketua (PLH),



dr. Denok Sri Utami, M.H

NIDN. 07 050966 01

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Tulungagung, Juli 2019

Penulis,

Vony Intan Prasasty



KATA PENGANTAR

Dengan mengucap syukur kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian. Adapun judul skripsi penelitian ini “Analisis Kadar Kafein Pada Coklat Hasil Produksi Industri Rumahan Kampung Coklat Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)”.

Proposal ini diajukan sebagai salah satu syarat melakukan penelitian pada Program Studi S1 Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tanpa bantuan dari berbagai pihak proposal ini tidak akan terwujud, oleh karena itu pada kesempatan ini peneliti mengucapkan terimakasih kepada :

1. dr. Denok Sri Utami M.H selaku ketua STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung.
2. Dara Pranindya Tilarso, S.Farm., Apt. Selaku Kaprodi S1 Farmasi STIKes Karya putra Bangsa Tulungagung.
3. Afidatul Muadifah S.Si., M.Si. Selaku pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan proposal penelitian ini.
4. Dhanang Prawira Nugraha, S.Farm., Apt. Selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan proposal ini.
5. Seluruh staf dosen dan karyawan Prodi S1 Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung yang telah membeikan pengetahuan, bantuan, dan bimbingan selama penulis mengikuti pendidikan.
6. Kedua orang tua yang selalu memberikan doa dan dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Lisa Yuhana, Amd.Farm yang selalu memberikan semangat dan dorongan untuk menyelesaikan skripsi ini.
8. Pihak laboratorium Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang sudah membantu dalam proses penyelesaian skripsi ini.

9. Pihak perpustakaan STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung yang memberi izin dalam menunjang penulisan proposal penelitian ini.
10. Teman-teman prodi S1 Farmasi yang selalu memberikan motivasi dalam penyelesaian skripsi ini.

Tulungagung, Juli 2019

Penulis

Vony Intan Prasasty



Persembahan

Kepada Allah SWT atas limpahan nikmat, kesehatan dan karunia serta hidayah-Nya.

Bapak dan Ibu atas kasih sayang dan pengorbanan kalian untuk pencapaianku serta doa restu hingga aku bisa berdiri sampai sekarang.

Saudaraku tersayang (Ria Rona Pawestri, Amd.Keb) yang selalu memberikan semangat dan dukungannya.

Mas Anta Choirurroziqin, yang memberikan motivasi dan semangat untuk masa depan

Teman-teman S1 Farmasi 2015, terimakasih sudah menjadi motivator dalam perjalanan mencari ilmu.

*"Hai orang-orang beriman apabila dikatakan kepadamu :
"berlapang-lapanglah dalam majlis", maka lapangkanlah niscaya Allah akan melapangkan untukmu", dan apabila dikatakan :
"Berdirilah kamu", maka berdirilah, niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan". (QS. Al-Mujadilah : 11)*

ANALISIS KADAR KAFEIN PADA COKLAT BATANG DAN COKLAT PERMEN HASIL PRODUKSI INDUSTRI RUMAHAN KAMPUNG COKLAT DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

Vony Intan Prasasty

Prodi S1 Farmasi

INTISARI

Indonesia merupakan negara ketiga pengeksport kakao terbesar di dunia. Biji kakao dianggap sebagai bahan yang sangat penting dalam industri berbagai makanan, salah satu jenisnya yaitu coklat. Coklat merupakan salah satu produk yang banyak disukai oleh kalangan remaja baik dalam bentuk minuman ataupun dalam bentuk permen, selain itu coklat juga merupakan salah satu jenis makanan yang mengandung kafein. Konsumsi makanan yang mengandung kafein dengan jumlah yang berlebih dapat menyebabkan beberapa gangguan kesehatan, salah satunya yaitu dapat mengakibatkan peningkatan pada hormon adrenalin. Penggunaan kafein dalam produk olahan juga dibatasi oleh pemerintah, penggunaan kafein menurut SNI 150mg/hari atau 50mg/sajian atau sebesar 800mg/100g coklat menurut *United States Department of Agriculture (USDA)*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar kafein pada coklat batang dan coklat permen serta menentukan adakah perbedaan kadar kafein pada sampel coklat tersebut. Sampel diekstraksi dengan menggunakan kloroform 20 ml diulang sebanyak 2 kali, dan dilakukan analisis menggunakan metode KCKT dengan kondisi instrumen fase gerak pada pengujian ini dengan menggunakan 100 ml campuran metanol dan akuadestilata (1:3 v/v) dilakukan secara isokratik dengan laju alir 1,5 mL/menit, dengan panjang gelombang 274 nm dan untuk mengetahui perbedaannya dilakukan dengan metode *independent sample t test*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu coklat batang dan coklat permen. Hasil dari analisis ini diperoleh kadar 12,25mg/5g untuk coklat batang dan 13,10mg/5g untuk coklat permen. Berdasarkan analisis menggunakan *independent sample t test* terdapat perbedaan yang signifikan kadar kafein pada coklat batang dan coklat permen.

Kata Kunci: Coklat, Kafein, KCKT, *independent sample t test*.

ANALYSIS CAFFEINE OF CHOCOLATE BARS AND CHOCOLATE CANDY PRODUCTION OF KAMPUNG COKLAT USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD

Vony Intan Prasasty

S1 Pharmacy Study Program

ABSTRACT

Indonesia is the third largest cocoa exporter in the world. Cocoa beans are considered a very important ingredient in various food industries, one of which is chocolate. Chocolate is one of the products that are liked by teenagers in the form of drinks or in the form of sweets, besides chocolate is also one type of food that contains caffeine. Consumption of food containing caffeine can cause several health problems, one of which is that it can lead to an increase in adrenal hormones. The use of caffeine in processed products is also limited by the government, the use of caffeine according to SNI 150 mg / day or 50 mg / serving or equal to 800 mg / 100 g of chocolate according to the United States Department of Agriculture (USDA). This study to determine the caffeine levels in chocolate bars and candy chocolate and determine whether there are differences in caffeine levels in the chocolate sample. The sample was extracted using 20 ml chlorophome repeated 2 times, and the analysis was carried out using the HPLC method with the condition of the mobile phase instrument in this test using 100 ml of methanol and aquadestilata mixture (1: 3 v / v) carried out isocratically with a flow rate of 1, 5 mL / minute, with a wavelength of 274 nm and to find the difference by the method of independent sample t test. The sample used in this study is chocolate bar and candy chocolate. The results of this analysis obtained levels of 12.25 mg / 5g for chocolate bars and 13.10 mg / 5g for candy chocolate. Based on the analysis using the Independent Sample T test there were significant differences in caffeine levels in chocolate bars and candy chocolate.

Keywords: Chocolate, Caffeine, HPLC, independent sample t test.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
INTISARI.....	viii
ABSTRAK	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kafein.....	5
2.2 Kakao	7
2.3 Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	8
2.3.1 Kromatografi	8
2.3.2 KCKT.....	9
2.3.3 Kolom KCKT	10
2.3.4 Fase Gerak.....	12
2.3.5 Elusi pada KCKT.....	12
2.3.6 Detektor.....	13
2.4 Sifat Fisika Kimia Pelarut	13

2.4.1	Akuadestilata	13
2.4.2	Metanol.....	13
2.4.3	Kloroform.....	14
BAB III METODOLOGI PENELITIAN		15
3.1	Bahan	15
3.2	Alat.....	15
3.3	Sampel.....	15
3.4	Variabel Penelitian.....	15
3.4.1	Variabel Bebas.....	15
3.4.2	Variabel Terikat	16
3.5	Hipotesis.....	16
3.6	Metode Penelitian	16
3.6.1	Preparasi Sampel.....	16
3.6.2	Ekstraksi Sampel Coklat	16
3.6.3	Pembuatan Larutan Standar.....	17
3.6.4	Analisa Kualitatif dan Kuantitatif Kafein	17
3.7	Analisis Statistika	18
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		19
4.1	Pengambilan Sampel Coklat	19
4.2	Preparasi Sampel Coklat	19
4.3	Ekstraksi Sampel Coklat	19
4.4	Pembuatan Larutan Standar Kafein	20
4.5	Uji Kualitatif dan Kuantitatif Kafein	20
4.5.1	Analisis Uji Kualitatis dan Kuantitatif	21
4.6	Perbandingan Statistika Kadar Kafein	23
4.7	Pengaruh Kafein terhadap Kesehatan	24
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		28
5.1	Kesimpulan.....	28
5.2	Saran	28
DAFTAR PUSTAKA		29

DAFTAR TABEL

Tabel	Hal
IV. 1 Data Hasil Perhitungan Kadar Kafein Sampel	23
IV. 2 Data Hasil Statistika Kadar Kafein	23
IV. 3 Data hasil dengan <i>Independent Sample t test</i>	24

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Hal
2.1 Struktur Kafein	6
2.2 Tanaman Kakao	8
2.3 Skema Kerja KCKT	10
2.4 Kolom C18 KCKT	12
4.1 Gambar Kromatogram	22
4.2 Gambar Struktur Kafein Dan Obat Penurun Asam Urat.....	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Hal
1. Perhitungan Pembuatan Larutan Standar	33
2. Rancangan Penelitian	34
3. Skema Kerja Pembuatan larutan Standar	35
4. Skema Kerja Preparasi Sampel.....	36
5. Ekstraksi Senyawa Kafein pada Sampel	37
6. Analisis Kualitatif Senyawa Kafein.....	39
7. Penetapan Kadar Kafein dalam Sampel dengan KCKT	41
8. Gambar Proses Analisis Senyawa Kafein dalam Sampel Coklat	43
9. Data Hasil Analisis Uji Kualitatif Kafein dengan KCKT	45
10. Analisa Statistika Perbedaan Kadar Coklat Batang dan Coklat Permen	46
11. Jadwal Penelitian	47

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman kopi dan kakao merupakan salah satu tanaman perkebunan yang sangat cocok ditanam di daerah tropis seperti wilayah Indonesia. Jumlah produksi dan kebutuhan masyarakat akan hasil perkebunan seperti biji kopi dan kakao semakin meningkat dan memiliki nilai jual tinggi seiring dengan tingkat konsumsi masyarakat terhadap kopi dan coklat (Suwanto, dkk., 2014).

Kakao termasuk salah satu komoditas unggulan dibidang perkebunan yang memberikan kontribusi yang cukup besar terhadap pemasukan devisa negara yang tiap tahunnya mengalami peningkatan. Indonesia merupakan negara ketiga pengeksport kakao terbesar di dunia (Herlinda, 2016). Biji kakao dianggap sebagai bahan yang sangat penting dalam industri berbagai makanan. Sebelum dapat digunakan sebagai salah satu bahan campuran dalam industri makanan atau minuman tersebut, buah kakao harus menjalani berbagai proses dalam pengolahannya untuk mendapatkan hasil yang diharapkan. Hasil olahan dari biji kakao berupa coklat (Dewi, 2012).

Dimasa sekarang jumlah konsumsi minuman yang mengandung kafein semakin meningkat hal ini dikarenakan banyaknya berbagai jenis minuman, tidak hanya kopi, coklat juga mengandung kafein dan banyak disukai oleh kalangan remaja baik dalam bentuk makanan ataupun minuman. Tjya dan Raharja (2007) mengatakan bahwa coklat mengandung alkaloid kafein yang memiliki efek farmakologis seperti menstimulasi susunan syaraf pusat, dengan efek menghilangkan rasa letih, lapar dan mengantuk, juga meningkatkan daya konsentrasi dan kecepatan reaksi, memperbaiki kerja otak dan memperbaiki suasana jiwa. Kafein yang berlebihan dapat menimbulkan debar jantung, gangguan lambung, tangan gemetar, gelisah, ingatan berkurang, dan sukar tidur. Berdasarkan FDA (*Food Drug Administration*), dosis kafein yang diizinkan dalam

penggunaannya 100mg – 200 mg per hari, sedangkan menurut SNI 01-7152-2006 batas maksimum kafein dalam makanan dan minuman adalah 150 mg/hari dan 50 mg/sajian (Wijayanti, 2017).

Penentuan senyawa kafein pada minuman dan makanan ringan salah satunya coklat untuk jaminan keamanan pangan dan kontrol kualitas adalah wajib. Beberapa metode analisis telah dikembangkan untuk penentuan kafein dan kontrol kualitas produk yang mengandung kafein termasuk titrimetri, voltametri, spektroskopi gelombang inframerah (*Near Infra-Red*), spektrofotometri derivatif, polarografi, kromatografi gas, dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Violeta *et al*, 2010).

Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Tsalis, dkk (2017) kristal kafein pada biji kakao rata – rata adalah 0.129 % dengan berat bobot kristal rata – rata 0.06 gram dengan menggunakan metode ekstraksi refluks, dan ditunjang dengan menggunakan analisa kromatografi lapis tipis, sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Sudiby, (2012) didapatkan kadar kafein pada coklat sebanyak 0,07 – 0,36 % dengan menggunakan metode yang sama.

Menurut S. Eeltink, (2004) dalam penelitian M.A. Rostagno *et al*, (2011) mengatakan bahwa metode KCKT mengalami peningkatan yang paling besar dalam pengembangannya, hal ini dapat dilihat dari tingkat selektifitas, sensitifitas dan akurasi, selain itu KCKT juga mampu memberikan informasi yang lengkap mengenai hasil analit yang dianalisa. Menurut Al-Obaidi, (2015), bahwa KCKT dapat dioperasikan dalam banyak metode, salah satunya peneliti dapat melakukan variasi fase gerak dan panjang gelombang untuk mendapatkan hasil analisis yang lebih akurat.

Kampung coklat merupakan tempat wisata edukasi yang berada di kabupaten Blitar Jawa Timur yang saat ini sedang banyak dikunjungi oleh para wisatawan, baik lokal, luar kota maupun manca negara. Tempat ini juga menyediakan berbagai macam olahan rumahan yang banyak digemari oleh para pengunjung, salah satunya coklat yang diproduksi sendiri oleh industri rumahan kampung coklat. Jenis coklat yang sangat digemari oleh pengunjung adalah coklat batang dan coklat permen.

Berdasarkan latar belakang masalah diatas peneliti melakukan penelitian yang ditujukan untuk menilai kadar kafein dalam coklat hasil produksi industri rumahan Kampung Coklat dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas rumusan masalah yang akan diteliti :

- 1.2.1** Berapakah kadar kafein yang terdapat pada sampel coklat batang hasil produksi industri rumahan kampung coklat yang dianalisis dengan metode KCKT ?.
- 1.2.2** Berapakah kadar kafein yang terdapat pada sampel coklat permen hasil produksi industri rumahan kampung coklat yang dianalisis dengan metode KCKT ?
- 1.2.3** Adakah perbedaan kadar kafein pada sampel coklat batang dan coklat permen ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini :

- 1.3.1** Untuk mengetahui kadar kafein pada coklat batang hasil produksi industri rumahan kampung coklat dengan metode KCKT.
- 1.3.2** Untuk mengetahui kadar kafein pada coklat permen hasil produksi industri rumahan kampung coklat dengan metode KCKT.
- 1.3.3** Untuk mengetahui perbedaan kadar pada kedua sampel coklat.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini :

1.4.1 Manfaat bagi peneliti

Peneliti dapat mengetahui kadar kafein yang terdapat dalam produk olahan coklat dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi dan proses optimasinya.

1.4.1 Manfaat bagi pemangku kebijakan

Dapat dijadikan sebagai bahan informasi terkait dengan produk coklat.

1.4.2 Manfaat bagi masyarakat

Untuk mengetahui lebih jauh manfaat dan efek samping kafein yang terkandung dalam coklat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kafein

Kafein, atau 1,3,7-trimetilxantin, merupakan metabolit sekunder yang ditemukan di daun, biji dan buah-buahan dari lebih dari 60 spesies tanaman, selain itu kafein juga terkandung dalam berbagai produk makanan seperti kopi, teh, yoghurt, minuman energi, minuman coklat dan minuman cola, berbagai jenis tersebut merupakan makan dan minuman yang paling banyak dikonsumsi dan secara umum memiliki psikomotor efek stimulan, tidak hanya pada makanan dan minuman obat-obatan golongan analgesik tertentu, juga mengandung cukup banyak jumlah kafein (E. Rudolph, *et al*, 2012).

Kafein berbentuk serbuk atau hablur bentuk jarum mengkilat biasanya menggumpal, berwarna putih, tidak berbau dan berasa pahit. Rumus kimia kafein adalah $C_8H_{10}N_4O_2$. Nama resmi kafein menurut IUPAC 1,3,5-trimetilxantin. Kafein sukar larut dalam air dan etanol 95% pekat, mudah larut dalam kloroform pekat, dan sukar laurt dalam eter pekat, penyimpanan dalam wadah tertutup baik. Kafein memiliki khasiat sebagai stimulan saraf, dosis maksimum sekali 500 mg dan dosis sehari 1,5 gram (Farmakope Indonesia edisi III, 1979).

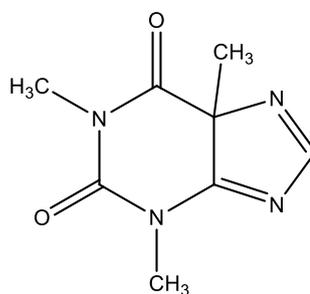
Kafein berbetuk anhidrat atau hidrat yang mengandung satu molekul air dan mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0% $C_8H_{10}N_4O_2$. Bentuk kafein serbuk putih berbentuk jarum mengkilat , biasanya menggumpal, tidak berbau, memiliki rasa pahit. Larutan bersifat netral terhadap kertas lakmus, bentuk hidratnya mekar diudara. Kafein memeiliki kelarutan agak sukar larut dalam air, dalam etanol, eter dan mudah larut dengan menggunakan kloroform (Farmakope Indonesia edisi IV, 1995).

Camargo, M.C.R dalam penelitian Violeta Nour, *et al* (2010) mengatakan bahwa kandungan kafein yang dilaporkan dalam sumber makanan utama bervariasi secara signifikan: 93,0 –163,5 mg per cangkir dalam kopi bubuk, 46,7 -

67,6 mg per cangkir dalam kopi instan, 30,2 - 67,4 mg per cangkir dalam teh kantung dan 0,32 - 0,54 mg / g dalam gelap coklat manis. Perbedaan tersebut telah dikaitkan dengan perbedaan metode persiapan sampel pada biji kopi atau daun teh.

Menurut Violeta Nour, *et al* (2010) jumlah kafein yang ditemukan dalam beberapa produk bervariasi - jumlah tertinggi ditemukan di guarana (4 - 7%), diikuti oleh daun teh (3,5%), biji kopi (1,1 - 2,2%), kacang cola (1,5%), dan biji kakao (0,03%). Kafein digunakan untuk memberikan dorongan energi yang tinggi. Perasaan yang menyenangkan, sering terjadi pada dosis rendah, akan tetapi pada dosis tinggi dapat menyebabkan gejala psikologis, kecemasan dan depresi neurosis. Diagnosis kondisi seperti itu harus mempertimbangkan penggunaan kafein. Kafein ditambahkan dalam minuman ringan sebagai agen penyedap, dan pada sumber makanan.

Menurut Komite Olimpiade Internasional obat yang mengandung kafein dapat diklasifikasikan sebagai obat yang tidak boleh digunakan, ketika kandungan kafein dalam urin pada tingkat konsentrasi lebih dari 12 µg/mL. Tingginya tingkat konsumsi kafein dapat mengakibatkan berbagai gangguan termasuk peningkatan sekresi asam lambung, kerusakan ginjal, penyakit jantung (aritmia jantung), dan gangguan sistem saraf pusat seperti kejang dan delirium, akan tetapi dalam beberapa obat menggunakan kafein sebagai pembantu kerja obat tersebut (Violeta, 2010). Struktur kafein dapat dilihat pada Gambar 2.1.



1, 3, 5- trimethylxanthine

Gambar 2.1 Struktur Kafein (FI edisi 3, 1979)

2.2 Kakao

Tanaman kakao merupakan tanaman yang menumbuhkan bunga dari batang atau cabang. Tanaman kakao digolongkan menjadi kelompok tanaman *Caulifloris*, adapun sistematika tanaman kakao secara botani adalah:

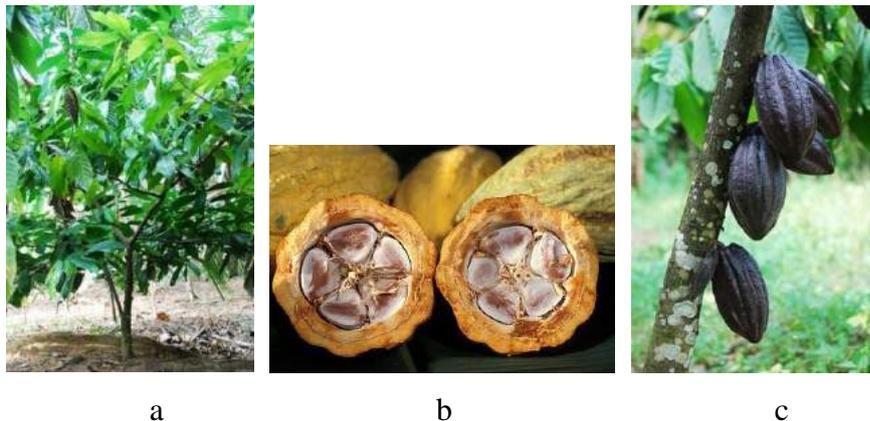
Kingdom	:Plantae
Subkingdom	:Tracheobionta
Superdivisi	:Spermatophyta
Divisi	:Magnoliophyta
Kelas	:Magnoliopsida
Subkelas	:Dilleniidae
Ordo	:Malvales
Famili	: <u><i>Sterculiaceae</i></u>
Genus	: <u><i>Theobroma</i></u>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> L. (Dewi, 2012).

Coklat adalah hasil olahan dari biji tanaman kakao (*Theobroma cacao*) yang tumbuh pertama kali di hutan lebat di Amerika Selatan dan Amerika Tengah. *Theobroma cacao* berasal dari famili *Sterculiaceae* dan memiliki empat jenis varietas yaitu criollo, nacional, forastero, dan trinitario, selain itu ada beberapa jenis coklat yang beredar dipasaran, misalnya coklat bubuk, coklat masak dan coklat keping. Kakao mengandung flavonoid dan kaya akan antioksidan, sehingga memiliki keuntungan bagi kesehatan yaitu kakao juga dapat mengurangi risiko penyakit kronis seperti penyakit kardiovaskular, kanker, dan penyakit lainnya yang berhubungan dengan usia (Afoakwa, 2010).

Menurut Rasyid, H.N dalam penelitian Faiz, dkk (2016) mengatakan bahwa kandungan flavonoid dalam biji coklat sekitar 12-18%. Flavonoid yang merupakan antioksidan endogen bekerja dengan menghambat reaksi radikal bebas dalam tubuh dan meningkatkan antioksidan endogen. Senyawa polifenol yang paling besar terdapat dalam coklat adalah golongan *flavanols*. Menurut Violeta Nour, *et al* (2010), kafein adalah golongan alkaloid yang terdapat dalam beberapa

tumbuhan seperti biji kopi, biji coklat, daun teh, dan kacang. Biji coklat mengandung kafein sebesar 0,03%.

Baskaran dalam penelitian Faiz, dkk (2016) mengatakan bahwa mekanisme kerja senyawa flavanoid yang terdapat dalam biji coklat dapat menurunkan kolesterol darah, dalam hal ini flavonoid memiliki mekanisme kerja dengan cara penghambatan terhadap HMG-CoA Reduktase. Penghambatan terhadap HMGCoA Reduktase memberikan efek penurunan sintesis kolesterol dan meningkatkan jumlah reseptor LDL yang terdapat dalam membran sel hepar dan jaringan ekstra hepatic, sehingga kadar kolesterol total dalam darah akan turun, dengan adanya penurunan kadar kolesterol maka LDL sebagai alat angkut lipid di dalam darah juga berkurang kadarnya. Morfologi tanaman kakao dapat dilihat pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Tanaman Kakao : a. Tanaman kakao; b. Biji kakao; c. Buah kakao (Dewi, 2012).

2.3 Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

2.3.1 Kromatografi

Rouessac, F dan Rouessac, A., (2007) mengatakan bahwa kromatografi merupakan suatu metoda pemisahan suatu senyawa tergantung pada perbedaan komponen-komponen yang akan dipisahkan, terdistribusi diantara dua fase. Pertama fase gerak yang dipompa dengan pompa tekanan tinggi dan fase diam

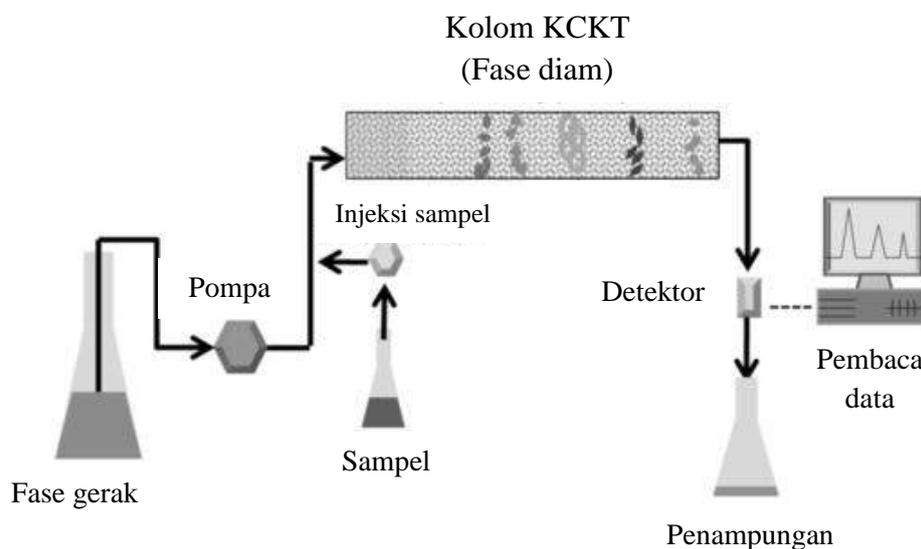
yang dikemas dalam kolom bahwa fase gerak disampaikan melalui retensi waktu dari senyawa yang akan dianalisis. Fase yang digunakan dipilih sedemikian rupa sehingga komponen sampel memiliki kelarutan yang berbeda pada setiap fase. Perbedaan migrasi atau perpindahan dari senyawa menyebabkan senyawa tersebut dapat dipisahkan. Kromatografi menjadi salah satu metode analisis utama untuk identifikasi dan kuantifikasi senyawa-senyawa dalam bentuk gas maupun cair. Dari semua teknik analisis instrumen, prosedur hidrodinamik ini menjadi salah satu teknik dengan aplikasi yang luas. Kromatografi menempati posisi yang dominan, karena semua laboratorium dapat melakukan analisis molekular.

2.3.2 KCKT

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah suatu teknik kromatografi yang paling dikenal dengan fase gerak yang berupa cairan. Penggunaan instrumen KCKT dalam analisis senyawa pada sampel hampir sama dengan *gas chromatography* (GC), hanya saja pada KCKT dapat ditambahkan untuk melakukan analisis beberapa senyawa yang sangat polar dan juga pada senyawa dengan berat molekul yang tinggi. Keberhasilan suatu analisis juga sangat dipengaruhi oleh ketepatan kromatografer dalam memilih dan menggunakan kolom dan komposisi fase gerak untuk mendapatkan nilai selektivitas yang besar sehingga interaksi antara analit, fase diam dan fase gerak dapat maksimal. Efisiensi kolom KCKT dapat dikatakan lebih rendah dibandingkan dengan GC, akan tetapi dengan fase diam baru yang dapat digunakan pada beberapa mode seperti pasangan ion atau peningkatan interaksi hidrofobik, sangat memungkinkan untuk penggunaan lebih lanjut pada KCKT. (Rouessac, F dan Rouessac, A., 2007).

Persiapan sampel yang akan dianalisis dengan KCKT, sampel cair atau sampel padat dilarutkan dengan menggunakan pelarut yang sesuai kemudian dialirkan pada kolom kromatografi dengan fase gerak cair. Kromatografi cair-cair didasarkan pada konsep koefisien partisi, yaitu setiap analit terpartisi diantara dua pelarut '*immiscible*' (yang tidak saling melarutkan). Satu pelarut dibuat

'*immobile*' (cairan yang disokong dengan padatan) dan yang satunya dibuat '*mobile*' (Rouessac, F dan Rouessac, A., 2007). Skema kerja KCKT dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Skema kerja KCKT (Rouessac, F dan Rouessac, A., 2007)

2.3.3 Kolom KCKT

Menurut Skoog, 2004, KCKT biasanya terdiri dari dua kolom yaitu kolom analitis (yang bertanggung jawab atas pemisahan) dan kolom *guard*. Kolom *guard* ditempatkan sebelum kolom analitis, yang berfungsi melindungi dari kontaminasi.

KCKT menggunakan kolom analitis yang terbuat dari *stainless steel* yang paling umum digunakan dengan diameter dalam antara 2,1 mm, 4,6 mm dengan panjang mulai dari sekitar 30 mm sampai 300 mm. Kolom yang mempunyai 12.500 plat teoritis memiliki panjang 25 cm dengan 50.000 plat/m (Skoog, 2004).

Fase gerak yang lebih sedikit digunakan pada kolom tipe mikrokolom oleh karena itu sampel diencerkan pada tingkat konsentrasi yang rendah untuk dapat menghasilkan sinyal yang lebih besar pada detektor. Kolom ini terbuat dari kapiler silika *fused* dengan diameter dalam 44-200 μm dan panjang hingga beberapa meter. Mikrokolom dikemas dengan partikel 3-5 μm dan disusun dengan efisiensi kolom yang mencapai 250.000 pelat teoritis (Skoog, 2004).

Analit yang terikat kuat (irreversibel) dengan fase diam menjadi masalah masalah yang cenderung dapat mempersingkat masa kolom, sehingga dapat mengurangi kinerja kolom dengan mengurangi fase diam yang tersedia. Materi partikulat yang diinjeksikan bersama dengan sampel dapat menyebabkan penyumbatan pada kolom. Kedua masalah ini dapat diatasi dengan penempatan kolom *guard* yang diletakkan sebelum kolom analitis. Kolom *guard* biasanya berisi materi partikulat kemasan yang sama dan fase diam seperti pada kolom analitik, akan tetapi secara signifikan lebih pendek dan lebih murah (panjang 7,5 mm dan biaya 1/10 dari kolom analitis). Penggantian kolom *guard* harus dilakukan secara teratur, karena dapat dimungkinkan pada sekali penggunaan kolom *guard* akan mengalami kerusakan (Skoog, 2004).

Kromatografi cair-cair, menggunakan fase diam adalah berupa cairan yang disokong dengan padatan, sehingga ketika di dalam kolom tidak ikut terelusi bersama fase gerak. Fase diam yang ikut terelusi bersama fase gerak kemungkinan tetap dapat terjadi sehingga menyebabkan fase diam “bergerak mengalir” melalui kolom dari waktu ke waktu. Partikel silika dibuat menjadi ikatan kovalen untuk mencegah hilangnya fase diam. Sifat dari fase diam ditentukan oleh sifat dari gugus alkil organosilan ini, apabila R adalah gugus fungsi polar, maka fase diam akan bersifat polar. Contoh fase diam polar yaitu apabila R terdiri dari gugus fungsi siano ($-C_2H_4CN$), diol ($-C_3H_6OCH_2CHOHCH_2OH$), atau amino ($-C_3H_6NH_2$). Ketika fase diam bersifat polar, maka fase gerak bersifat non polar atau semi polar. Kombinasi dari fase diam polar dan fase gerak non polar disebut dengan kromatografi fase normal (*normal-phases chromatography*) (Harvey, 2000).

Kromatografi yang lebih umum ditemui pada bentuk KCKT adalah kromatografi fase terbalik (*reverse-phases chromatography*), yang mana fase diamnya bersifat non polar dan fase gerak bersifat polar. Organoklorosilane adalah fase diam non polar yang paling umum digunakan dengan R terdiri dari kelompok n-oktil (C_8) atau rantai hidrokarbon n-oktildesil (C_{18}). Larutan penyangga sebagai fase gerak polar digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik, karena substrat silika adalah subjek untuk hidrolisis dalam larutan dasar,

pH fase gerak harus kurang dari 7,5 (Harvey, 2000). Kolom KCKT C18 dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Kolom C18 KCKT (Harvey, 2000)

2.3.4 Fase Gerak

Polaritas mengatur urutan elusi analit pada KCKT. Pemisahan fase normal analit paling non polar menghabiskan waktu interaksi paling sedikit dengan fase diam (polar) dan menjadi analit yang terelusi pertama dari kolom. Waktu retensi diatur dengan memilih fase gerak yang digunakan, dengan fase gerak yang non polar maka waktu retensi akan lebih lama. Fase gerak yang lebih polar dapat memberikan waktu pemisahan yang lebih pendek/cepat ketika hanya ada dua analit yang akan dipisahkan (Harvey, 2000).

Proses elusi dapat dibalik pada pemisahan fase terbalik, dengan analit yang paling polar menjadi yang pertama terelusi. Waktu retensi lebih lama dapat diakibatkan karena adanya peningkatan polaritas fase gerak, sedangkan waktu retensi lebih pendek membutuhkan fase gerak dengan polaritas yang rendah (Harvey, 2000).

2.3.5 Elusi pada KCKT

Metode isokratik adalah metode elusi ketika komponen fase gerak tidak berubah selama analisis (komposisi konstan). Metode gradien adalah metode elusi dengan komposisi fase gerak diubah selama proses analisis (biasanya dengan meningkatkan jumlah pelarut organik) (Harvey, 2000).

2.3.6 Detektor

Karakteristik yang harus dimiliki oleh suatu detektor adalah detektor harus memiliki respon terhadap larutan yang cepat, sensitivitas yang tinggi, stabil mempunyai volume sel yang kecil sehingga dapat mampu meminimalkan pelebaran pita, sinyal yang dihasilkan harus dapat berbanding lurus dengan konsentrasi larutan, tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak (Rohman, 2009). Detektor yang paling sering digunakan adalah detektor UV-Vis. Detektor ini didasarkan pada adanya penyerapan radiasi sinar ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Vis) pada kisaran panjang gelombang 190-800nm. Detektor pada umumnya memiliki sel yang berupa tabung dengan diameter 1 mm dan panjang celah optiknya 10 mm, serta diatur sedemikian rupa sehingga mampu menghilangkan pengaruh indeks bias yang dapat mengubah absorbansi yang terukur (Kar, 2005).

2.4 Sifat Fisika Kimia Pelarut

2.4.1 Akuadestilata

Menurut farmakope Indonesia edisi III (1979), air suling dibuat dengan menyuling air yang dapat diminum. Pemerian air suling yaitu cairan jernih, tidak memiliki warna, tidak berbau, dan tidak mempunyai rasa. Air suling memiliki rumus kimia H_2O , dan berat molekul 18,02.

2.4.2 Metanol

Menurut farmakope Indonesia edisi III (1979), pemerian metanol yaitu cairan tidak berwarna atau jernih dan memiliki bau yang khas. Metanol memiliki rumus kimia CH_3OH . Kelarutan metanol dapat bercampur dengan air membentuk cairan jernih tidak berwarna, memiliki bobot jenis 0,796 sampai 0,798. Jarak titik didih metanol kurang dari 95% tersuling pada suhu antara $64,5^{\circ}C$ dan $65,5^{\circ}C$.

2.4.3 Kloroform

Menurut farmakope Indonesia edisi III (1979), kloroform adalah triklorometana, mengandung etanol 1,0% v/v sampai dengan 2,0% v/v sebagai zat penstabil. Pemerian kloroform bersifat cair, mudah menguap, tidak berwarna, memiliki bau yang khas dengan rasa mani yang membakar. Kloroform mudah larut dalam kurang lebih 200 bagian air, larut dalam etanol pekat, dalam eter pekat, dalam sebagian besar pelarut organik, dalam minyak atsiri dan dalam minyak lemak. Kloroform memiliki berat molekul 119,38. Titik didih kloroform tidak lebih dari 5% v/v tersuling pada suhu dibawah 60°C. Penggunaan kloroform digunakan untuk zat tambahan.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah kafein dalam bentuk bubuk yang bebas kandungan air sebesar 98%, coklat batang, coklat permen, akuadestilata, metanol, klorofom, CaCO₃.

3.2 Alat

Peralatan yang digunakan adalah seperangkat alat kromatografi cair kinerja tinggi, gelas beker, pipet volum, batang pengaduk, kompor listrik, kertas saring, corong kaca, dan corong pisah.

3.3 Sampel

Sampel merupakan suatu sub kelompok atau sebagian dari populasi yang dipilih untuk melakukan sebuah penelitian (Amirullah, 2015).

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan *purposive sampling*, yaitu pengambilan sampel didasarkan pada kriteria yang dibuat oleh peneliti sendiri berdasarkan cir-ciri atau sifat-sifat populasi yang sudah diketahui sebelumnya. Kriteria yang ditentukan berdasarkan jumlah konsumen yang paling banyak.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah coklat batang dan coklat permen yang mengandung kafein.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar kafein dalam coklat.

3.5 Hipotesis

Menurut Sugiyono (2013), hipotesis merupakan jawaban sementara terhadap rumusan masalah penelitian, dimana rumusan masalah penelitian telah dinyatakan dalam bentuk kalimat pertanyaan. Berdasarkan penelitian sebelumnya hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa H_a diterima artinya ada perbedaan antara kadar kafein pada coklat batang dan coklat permen. Hipotesis dalam analisis ini adalah ada perbedaan kadar kafein pada sampel coklat batang dan coklat permen (Violeta, 2010).

3.6 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen/percobaan. Penetapan kadar kafein pada coklat dilakukan secara kuantitatif. Pengujian kuantitatif dilakukan dengan menggunakan KCKT.

3.6.1 Preparasi Sampel

Ditimbang 5 gram masing-masing sampel coklat batang dan coklat permen, selanjutnya dimasukkan kedalam mortir dan digerus hingga membentuk partikel yang lebih kecil, selanjutnya setelah proses preparasi selesai dilanjutkan dengan proses ekstraksi sampel.

3.6.2 Ekstraksi Sampel Coklat

Tahap ekstraksi ini bertujuan untuk pengambilan senyawa kafein yang berada dalam sampel. Sampel yang digunakan sebanyak 5 gram dari hasil preparasi dan ditambah dengan 100 mL akuadestilata dan 5 gram CaCO_3 , kemudian didihkan, diaduk hingga larut. Sampel disaring menggunakan kertas saring dalam keadaan panas, dan hasil saringan ditampung dalam gelas beker. Filtrat diekstraksi dengan ditambah 30 mL klorofom masukkan pada corong pisah dan digojog hingga membentuk 2 lapisan, fase klorofom terdapat pada lapisan

bawah. Pisahkan fase klorofom (lapisan bawah). Fase air diekstraksi lagi dengan menggunakan klorofom 20 mL digojog hingga membentuk lapisan 2 lapisan. Pisahkan fase klorofom dan dikumpulkan. Filtrat diuapkan kedalam cawan penguap dengan menggunakan penangas air sampai fraksi klorofom hilang.

3.6.3 Pembuatan Larutan Standar

Larutan standar dibuat dengan menimbang 10 mg serbuk kafein dan dilarutkan dalam 100 mL campuran akuades dan metanol menggunakan dengan perbandingan 3:1 dengan konsentrasi 100 ppm.

3.6.4 Analisa Kualitatif dan Kuantitatif Kafein

Sampel yang sudah dipreparasi kemudian dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi. Tujuan dari analisis kualitatif dan kuantitatif ini bertujuan untuk menentukan kadar kafein yang terkandung di dalam sampel.

3.6.4.1 Penetapan Kadar Kafein Menggunakan KCKT

Penetapan kadar kafein dilakukan dengan cara masing-masing larutan uji diinjeksikan ke dalam wadah sampel pada KCKT. Sampel yang sudah ekstraksi, hasil ekstraknya diambil sebanyak 5 mg dilarutkan kedalam akuadestilata 75 mL dan metanol 25 mL dengan perbandingan 3:1, diaduk hingga larut dan disaring dengan menggunakan kertas saring untuk mendapatkan sampel yang jernih.

Analisis kafein dilakukan dengan pengambilan sampel yang sudah dilarutkan dengan pelarut, diambil sebanyak 1,5 μ L untuk diinjeksikan kedalam instrumen KCKT, kondisi fase gerak pada pengujian ini dengan menggunakan 100 mL campuran metanol dan akuadestilata (1:3 v/v) dilakukan secara isokratik dengan laju alir 1,5 mL/menit, dengan panjang gelombang 274 nm. Penetapan kadar kafein pada sampel dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kafein dalam coklat} = \frac{800\text{mg}}{100\text{g}} = \frac{\text{mg kafein}}{5\text{g sampel}} \dots\dots\dots(3.1)$$

3.7 Analisis Statistika

Analisis statistika pada penelitian ini menggunakan uji statistik *independent sample T-test* dengan membandingkan rata-rata dari dua grup yang tidak berhubungan satu dengan yang lain, dengan tujuan apakah kedua grup tersebut mempunyai perbedaan atau tidak (Sujarweni, 2012).

Membaca output *independen sample T-test* (signifikan F-hitung) untuk menentukan t hitung yang digunakan untuk menjawab rumusan masalah, menggunakan *equal variances assumed* atau *equal variances not assumed*.

Pengambilan keputusan dilakukan sebagai berikut :

Jika Sig. (2-tailed) > 0,05 maka Ho diterima.

Jika Sig. (2-tailed) < 0,05 maka Ho ditolak atau Ha diterima.

Ho ditolak artinya : kedua varian identik atau tidak ada perbedaan.

Ha diterima artinya : kedua varian memiliki perbedaan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung dan di Laboratorium Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, pada tanggal 4 Maret – 2 April 2019. Penelitian ini menggunakan coklat batang dan coklat permen sebagai sampel penelitian. Sampel coklat dibeli di Industri Rumahan Kampung Coklat, dari penelitian yang sudah dilakukan didapatkan hasil sebagai berikut :

4.1 Pengambilan Sampel Coklat

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan *purposive sampling*, yaitu pengambilan sampel didasarkan pada suatu pertimbangan tertentu yang dibuat oleh peneliti sendiri berdasarkan ciri-ciri atau sifat-sifat populasi yang sudah diketahui sebelumnya. Penelitian ini didapatkan 2 sampel coklat dengan jumlah peminat atau konsumen paling banyak. Sampel tersebut yaitu coklat batang dan coklat permen.

4.2 Preparasi Sampel Coklat

Dilakukan penimbangan sebanyak 5 gram pada sampel coklat, selanjutnya dimasukkan ke dalam mortir dan dilakukan penggerusan hingga membentuk partikel yang lebih kecil, selanjutnya setelah proses preparasi selesai dilanjutkan dengan proses ekstraksi sampel.

4.3 Ekstraksi Sampel Coklat

Tahap ekstraksi ini bertujuan untuk pengambilan senyawa kafein yang berada dalam sampel. Sampel yang digunakan sebanyak 5 gram dan diberikan penambahan 100 mL akuadestilata dan 5 gram CaCO_3 , kemudian dididihkan, dilakukan pengadukan hingga larut. Proses pendidihan ini bertujuan untuk melarutkan secara maksimal senyawa kafein yang dapat terlarut 1,5 bagian air mendidih menurut Wilson & Gilvold (1982), dalam Fajriana (2018). Penambahan

CaCO_3 menurut Mahendrata (2007), dalam Fajriana (2018) berfungsi untuk memutuskan ikatan kafein dengan senyawa lain, sehingga kafein akan ada dalam basa bebas.

Proses selanjutnya dilakukan penyaringan pada sampel menggunakan kertas saring dalam keadaan panas, dan dilakukan penampungan pada filtrat dalam gelas beker. Ekstraksi pada filtrat dilakukan dengan menambah 30 mL klorofom pada corong pisah dan dilakukan penggojogan hingga membentuk lapisan. Lakukan pemisahan pada fase klorofom (lapisan 1). Fase air diekstraksi lagi dengan menggunakan klorofom 30 mL lakukan penggojogan hingga dua membentuk lapisan. Lakukan pemisahan fase klorofom dan dikumpulkan. Penguapan filtrat dilakukan pada cawan penguap dengan menggunakan penangas air sampai fraksi klorofom hilang.

Ekstraksi kafein menggunakan pelarut kloroform, karena senyawa kafein merupakan senyawa golongan alkaloid yang akan lebih cepat larut dalam klorofom dibandingkan pelarut lainnya seperti Dietil eter, Karbon tetraklorida, dan n-heksana (Roosenda, 2016).

4.4 Pembuatan Larutan Standar Kafein

Pembuatan larutan standar dilakukan dengan cara menimbang 10 mg serbuk kafein dan melarutkan serbuk kafein kedalam 100 mL campuran metanol dan akuadestilata dengan menggunakan perbandingan 1:3 dengan konsentrasi 100 ppm. Tujuan dari campuran fase gerak tersebut dikarenakan kafein bersifat semi polar, sedangkan larutan tersebut bersifat polar sehingga akan lebih mudah dalam proses pelarutan. Pembuatan larutan standar ini bertujuan untuk menentukan kurva standar selain itu juga untuk membandingkan antara respon standar dengan respon sampel (Gandjar, 2018).

4.5 Uji Kualitatif dan Kuantitatif Kafein

Uji kualitatif dan kuantitatif dilakukan dengan menggunakan KCKT Pengujian ini dilakukan dengan mengambil sampel yang sudah ekstraksi, lakukan pengambilan dari hasil ekstrak sebanyak 5 mg dilarutkan ke dalam akuades 75 mL

dan metanol 25 mL dengan perbandingan 3:1, diaduk hingga larut dan disaring dengan menggunakan kertas saring untuk mendapatkan sampel yang jernih.

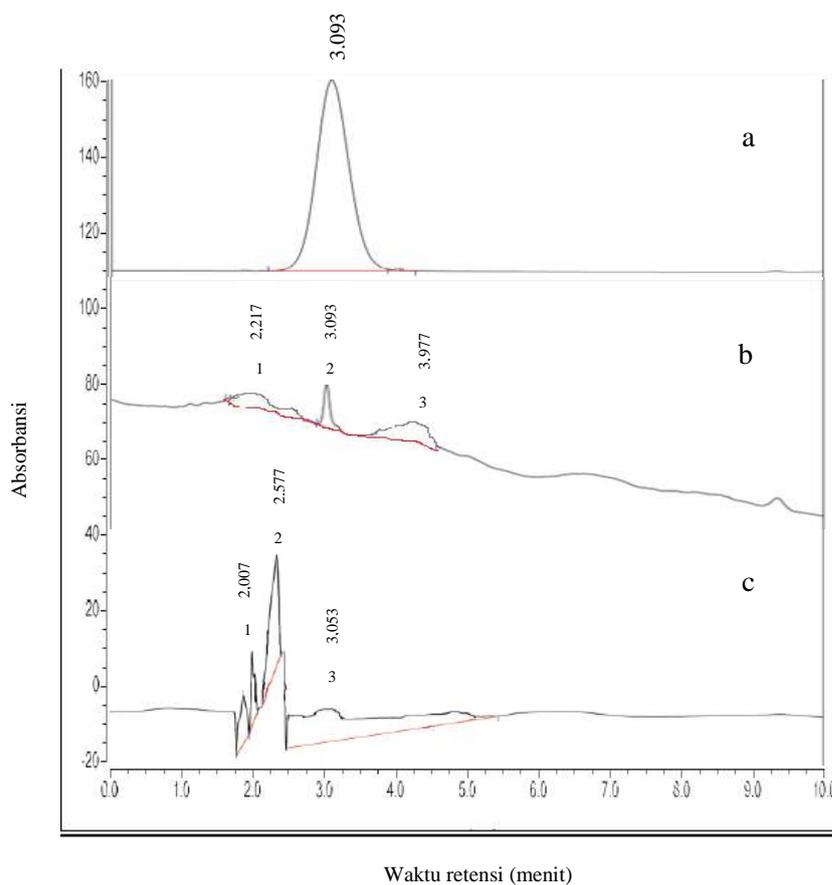
Analisis kafein dilakukan dengan pengambilan sampel yang sudah dilarutkan dengan pelarut, selanjutnya mengambil sebanyak 1,5 μ L untuk diinjeksikan ke dalam instrumen KCKT, kondisi fase gerak pada pengujian ini dengan menggunakan 100 mL campuran metanol dan akuadestilata (1:3 v/v) yang bersifat polar dan fase diam yang digunakan C18 yang bersifat non polar, dilakukan secara isokratik dengan laju alir 1,5 mL/menit, dengan panjang gelombang 274 nm. Proses elusi terjadi karena adanya perbedaan sifat antara senyawa yang bersifat semi polar dengan fase diam yang bersifat non polar, senyawa yang memiliki sifat berbeda dengan fase diam akan terelusi terlebih dahulu dibandingkan dengan senyawa yang memiliki sifat kepolaran sama dengan dengan fase diam. Kolom C18 mempunyai diameter dalam antara 2,1 mm dan 4,6 mm dan panjang mulai dari sekitar 30 mm sampai 300 mm yang mempunyai 12.500 plat teoritis memiliki panjang 25 cm dengan 50.000 plat/m tujuan penggunaan kolom tersebut karena menggunakan analisis dengan fase terbalik (Skoog, 2004). Penggunaan campuran fase gerak tersebut bertujuan untuk mendapatkan pemisahan yang optimum pada senyawa kafein, hal ini dikarenakan campuran fase gerak tersebut memiliki sifat polar, sedangkan kafein memiliki sifat semi polar, selain itu kafein juga dilarutkan dengan menggunakan fase gerak.

4.5.1 Analisis Hasil Uji Kualitatif dan Kuantitatif

Uji kualitatif menunjukkan adanya puncak yang mempunyai waktu retensi sama dengan puncak kromatogram pada standar kafein maka dari hasil analisis dengan KCKT dapat dipastikan bahwa kedua sampel coklat mengandung kafein. Senyawa kafein yang terelusi pada gambar 4.1.a merupakan kromatogram senyawa dari standar kafein, yang ditunjukkan dengan adanya puncak pada menit ke 3, pada gambar 4.1.b kromatogram sampel coklat batang yang didapat dari hasil analisis, ditunjukkan dengan adanya puncak berjumlah 3, dimana senyawa kafein ditunjukkan pada puncak nomer 2 yang terelusi pada waktu retensi 3,093 menit dan luas area 0,151 mAu, sedangkan pada gambar 4.1.c kromatogram sampel coklat permen yang didapat dari hasil analisis, ditunjukkan dengan adanya

puncak yang berjumlah 3, dimana senyawa kafein ditunjukkan dengan puncak nomer 3 yang terelusi pada waktu retensi 3,053 menit dan luas area 2,106 mAu. Menurut Snyder (2010), variasi waktu retensi yang diperbolehkan yaitu $\leq 0,05$ menit, pada hasil uji kualitatif diatas memiliki variasi waktu retensi kafein yaitu 0,04 menit.

Hasil analisis kualitatif menunjukkan bahwa senyawa kafein terelusi pada menit 3, hal ini dikarenakan penggunaan fase gerak dan senyawa yang bersifat polar dan penggunaan fase diam berupa kolom C18 yang bersifat non polar. Kromatogram analisis kualitatif kafein dengan menggunakan KCKT dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Kromatogram (a) standar kafein konsentrasi 100ppm (b) sampel coklat batang (c) sampel coklat permen

Tabel IV.1 Data hasil perhitungan kadar kafein pada sampel

Sampel	Kadar (% b/b)	Kadar (mg/5g)
Coklat batang	30,64	12,25
Coklat permen	32,77	13,10

Berdasarkan perhitungan penetapan kadar yang menggunakan rumus (3.1) didapatkan hasil sesuai Tabel IV.1, dengan nilai kadar kafein pada sampel coklat batang dan coklat permen yaitu 12,25 mg dan 13,10 mg, dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa kedua sampel mempunyai kadar kafein yang tidak melebihi batas dari yang ditentukan oleh SNI 01-7152-2006, yaitu batas maksimum kafein dalam makanan dan minuman adalah 150 mg/hari dan 50 mg/sajian atau sebesar 800mg/100g (Wijayanti, 2017). Masyarakat dalam mengkonsumsi coklat permen harus diperhatikan jumlah konsumsinya, dengan cara mengkonsumsi coklat permen sehari tidak melebihi 7 coklat permen, karena dalam 4 biji coklat permen mengandung 13,10 mg kafein, sedangkan untuk konsumsi coklat batang dengan berat 250 gram dimana setiap 5 gram coklat batang mengandung 12,25 mg , sehingga dengan berat coklat batang tersebut dapat dikonsumsi selama kurang lebih 20 hari. Perhitungan penetapan kadar kafein dapat dilihat pada Lampiran (L.7)

4.6 Perbandingan Statistika Kadar Kafein

Berdasarkan hasil kadar kafein pada Tabel IV.1 dianalisis statistika dengan menggunakan metode *independent sample t test*, didapat hasil sebagai berikut :

Tabel IV.2 Data hasil statistika kadar kafein

Jenis_Ckt	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Kadar Batang	3	12.2600	.01000	.00577
Permen	3	13.1033	.00577	.00333

Berdasarkan Tabel IV.2 dapat dilihat rata-rata kadar dari sampel coklat batang yaitu 12,2600 dan untuk coklat permen sebesar 13,1033 dengan deviasi standar 0,01000 untuk coklat batang dan 0,00577 untuk coklat permen.

Tabel IV.3 Data hasil dengan *independent sample t test*

		t-test for Equality of Means				
		t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
Kadar	Equal variances assumed	-126.500	4	.000	-.84333	.00667
	Equal variances not assumed	-126.500	3.200	.000	-.84333	.00667

Berdasarkan pada Tabel IV.3, penafsiran tabel output *independent sample t test* diatas berpedoman pada nilai yang terdapat dalam tabel “*Equal variances assumed*”, dari penafsiran tersebut maka diketahui nilai *p-value* sebesar 0,000 yang artinya kurang dari 0,05 ($0,000 < 0,05$), maka hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa H_0 ditolak dan H_a diterima yang artinya bahwa ada perbedaan yang nyata antara kadar coklat batang dan coklat permen.

4.7 Pengaruh Kafein Terhadap Kesehatan

Menurut Aurnaud, (1987) pada penelitian H. N. Wanyika *et al*, (2010) mengatakan bahwa kafein merupakan senyawa alkaloid turunan metilxantin yang merupakan metabolit sekunder yang ditemukan pada daun, biji atau buah pada lebih dari 63 spesies tanaman di seluruh dunia misalnya pada teh, kopi coklat dan kacang.

Menurut Coffefag, (2001) dalam penelitian Fajriana, (2018) efek farmakologis yang terdapat dalam kafein memiliki manfaat secara klinis, seperti menstimulasi susunan syaraf pusat, relaksasi otot polos terutama otot polos bronkus dan stimulasi otot jantung. Kafein memiliki mekanisme kerja dapat menyekat reseptor adenosin, menghambat enzim fosfodiesterase, dan menginduksi translokasi kalsium intraseluler (Orru, 2013).

Hormon adrenalin, atau kadang disebut juga epinefrin, merupakan hormon yang diproduksi oleh kelenjar adrenal dan otak. Peningkatan hormon adrenalin dalam tubuh dapat disebabkan karena adanya pengaruh kadar kafein yang berlebihan sehingga dapat menyebabkan peningkatan aktivitas otot jantung dalam memompa darah dan meningkatkan tekanan darah, sehingga aliran darah ke berbagai organ tubuh meningkat. Kondisi tersebut dapat menyebabkan timbulnya perasaan segar atau hilangnya rasa lelah setelah mengkonsumsi kafein (Orru, 2013)

Kafein tidak hanya bekerja pada reseptor adenosin, kafein juga menstimulasi pelepasan norepinefrin, menghambat pemecahan adenosin monofosfat siklik (cAMP), meningkatkan kerja guanosisne monofosfat siklik (cGMP), dan meningkatkan efek dopamin postsinaps. Kafein diduga juga berpengaruh terhadap reseptor gamma aminobutirat (GABA) dan serotonin (Orru, 2013).

Menurut Takeda, (1994) dalam Martono, (2015) kandungan kafein yang tinggi (lebih dari 200mg/konsumsi) kurang diinginkan karena sifat farmakologinya dapat merangsang sistem saraf pusat. Kafein dapat dikonsumsi secara aman, tetapi zat tersebut dapat menimbulkan reaksi yang tidak dikehendaki jika dikonsumsi secara berlebihan seperti tidak dapat tidur (insomnia), rasa gelisah (ansietas), mengigau (delirium), jantung berdenyut lebih cepat (takikardi), denyut jantung premature sebelum denyut jantung kembali normal (ekstrasistole), pernapasan meningkat, tremor otot, dan peningkatan produksi urin oleh ginjal (diuresis).

Thomson, (2011) dalam penelitian Safitri, (2015) mengatakan bahwa asupan tinggi kafein dapat meningkatkan pengeluaran kalsium urin melalui mekanisme penurunan reabsorpsi kalsium di ginjal sehingga menyebabkan keseimbangan kalsium menjadi negatif yang nantinya akan mempengaruhi kepadatan tulang, hal inilah yang selanjutnya akan berpengaruh terhadap terjadinya osteoporosis pada orang dewasa apabila mengkonsumsi kafein dalam jumlah yang berlebihan. Penelitian yang telah dilakukan mengatakan bahwa, mengkonsumsi minuman yang mengandung kafein dengan kadar lebih dari 300mg/hari dapat menjadi faktor resiko terjadinya osteoporosis, hal ini

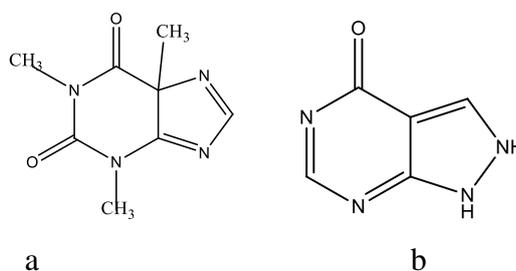
dikarenakan efek diuretik kafein dapat mengganggu penyerapan kalsium dan selain itu dapat meningkatkan ekskresi kalsium setelah 3 jam dikonsumsi, hal ini yang menyebabkan banyaknya kadar kalsium dalam urin. Kejadian ini dapat terjadi dalam jangka waktu kurang lebih 2-3 tahun setelah mengonsumsi kafein (Juniarsana dan Wiardani, 2012).

Hipertensi atau tekanan darah tinggi adalah suatu kejadian yang diakibatkan adanya peningkatan abnormal tekanan darah dalam pembuluh darah arteri secara terus-menerus. Kafein dapat menstimulasi jantung untuk bekerja lebih cepat sehingga mengalirkan lebih banyak cairan setiap detiknya. Senyawa kafein menghasilkan efek antagonis yang kompetitif terhadap reseptor adenosin, adenosin merupakan neuromodulator yang dapat mempengaruhi sejumlah fungsi pada susunan saraf pusat, hal ini berdampak pada vasokonstriksi dan dapat meningkatkan total perifer resisten, yang akan menyebabkan tekanan darah naik (Michael J. Klag. Dkk. 2010) dalam Rahmawati (2016). Mengonsumsi makanan dan minuman yang mengandung kafein lebih dari 200-250mg/hari akan menyebabkan terjadinya peningkatan tekanan darah sistolik 3-14 mmHg dan untuk tekanan darah sistolik mengalami peningkatan sebanyak 4-13 mmHg dengan waktu yang relatif cepat setelah dikonsumsi oleh orang yang mempunyai tekanan darah normal (Ratnasari, 2015).

Menurut Plaoze (2012) dalam penelitian Mulyono (2018) asam urat merupakan produk akhir dari metabolisme purin yang dapat mengendap dalam jaringan dan menyebabkan peradangan yang dikenal dengan *gout*. *Gout* merupakan salah satu penyakit metabolik yang terjadi akibat tingginya kadar asam urat dalam darah. Penelitian yang dilakukan oleh peneliti terdahulu menunjukkan bahwa kandungan kafein yang terdapat dalam makanan dan minuman dapat mempengaruhi kadar asam urat dalam darah (Mulyono, 2018). Kadar kafein yang mampu menurunkan asam urat sebesar 50mg/sajian, dan proses penurunannya akan terjadi secara perlahan dalam kurun waktu kurang lebih 2-5 bulan, penurunannya sebesar 1,2mg/dL. Kafein yang terkandung dalam biji kakao secara klinis terbukti dapat meningkatkan produksi ekskresi urine dengan cara meningkatkan nilai *Glomerulus Filtration Rate* (GFR) (Herlambang, 2018).

Ekskresi urine yang tinggi menyebabkan ekskresi metabolit-metabolit darah yang lain pun akan naik, termasuk di dalamnya adalah asam urat. Menurut Lelyana (2008) dalam Halimah (2017) kafein mempunyai efek menaikkan kadar enzim xanthin oksidase sehingga kadar asam urat dalam darah dapat diturunkan. Kafein dengan struktur kimia metilxantin yang telah diketahui mempunyai sifat dapat menurunkan kadar asam urat di dalam tubuh, selain itu struktur kimia pada kafein memiliki kemiripan dengan obat penurun asam urat yaitu allopurinol. Kemiripan yang dimiliki pada kedua struktur tersebut terdapat pada atom H, C, dan atom N dengan jumlah yang hampir sama.

Mekanisme pelepasan asam urat terjadi melalui proses pelepasan sumber purin. Sumber purin di dalam tubuh berasal dari tiga jalur. Pertama purin yang diperoleh dari luar tubuh yaitu dari berbagai minuman atau makanan yang mengandung purin sebanyak 300 mg. Kedua sumber purin diperoleh dari dalam tubuh dengan cara memecah jenis purin endogen. Ketiga sumber purin diperoleh dari dalam tubuh yang dihasilkan dari sintesa purin berupa molekul-molekul sederhana. Ketiga sumber purin tersebut akan menghasilkan purin nukleotida, selanjutnya proses ini akan mengalami katabolisme berupa asam urat. Asam urat hasil katabolisme tersebut akan diekskresi melewati ginjal dan usus. Jumlah nilai asam urat yang diekskresi melalui usus sebanyak 1/3 bagian, pada proses ini asam urat akan mengalami urikolisis yang diubah menjadi dua metabolit berupa CO₂ dan NH₃. Sedangkan jumlah asam urat yang melalui ginjal sebanyak 2/3 bagian, akan diekskresikan bersama urin (Soemantri, 2011). Struktur senyawa kafein dan struktur senyawa obat penurun asam urat dapat dilihat pada Gambar 4.2



Gambar 4.2. Struktur senyawa. a. Kafein, b. Obat penurun asam urat.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan untuk mengetahui kadar kafein dalam sampel coklat hasil industri rumahan kampung coklat dengan metode KCKT diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Berdasarkan pengujian menggunakan metode KCKT didapatkan kadar kafein pada coklat batang sebanyak 12,25 mg/5g.
2. Berdasarkan pengujian menggunakan metode KCKT didapatkan kadar kafein pada coklat permen sebanyak 13,10 mg/5g.
3. Berdasarkan uji analisis perbandingan hasil kadar dengan menggunakan metode *independent sample t test* nilai hasil penafsiran nilai *p-value* dapat disimpulkan bahwa H_0 ditolak dan H_a diterima yang artinya bahwa ada perbedaan yang nyata antara kadar coklat batang dan coklat permen.

5.2 Saran

1. Bagi masyarakat

Jumlah coklat permen yang dikonsumsi setiap harinya tidak boleh lebih dari 7 permen dalam sehari, dan jumlah coklat batang yang dikonsumsi tidak boleh lebih dari 10 gram dalam sehari atau kurang lebih $\frac{1}{4}$ batang dari berat batang 250 gram.
2. Bagi peneliti lain
 - a. Dapat dilakukan analisis dengan menggunakan instrumen KCKT-MS dengan metode spiking untuk menghasilkan hasil yang lebih baik.
 - b. Dapat dilakukan pengujian kandungan senyawa lain dalam sampel coklat.

DAFTAR PUSTAKA

- A.A, Rahim S. Nofrizal, ABahruddin Saad. 2014. *Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column*. Food Chemistry 147 (2014) 262–268.
- Al-Obaidi, Zaid. 2015. *The Qualification and Quantification of Caffeine in Two Different Caffeinated Pharmaceutical Formulas Employing RP-HPLC Technique*. Quarterly Adjudicated Journal for Natural and Engineering Research and Studies. Vol. 2, No. 3 and 4, P.(76-91)E.
- Amirullah. 2015. *Populasi Dan Sampel (pemahaman, jenis dan teknik)*. Disarikan dari buku; Metode Penelitian Manajemen Bayumedia Publishing. Malang.
- Ansel, 2014. *Ansel. Bentuk Sediaan Farmasetis & Sistem Penghantaran Obat*. Diterjemahkan oleh Lucia Hendriati dan Kuncoro Foe, Edisi Kesembilan, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Depkes RI. 1979. *Farmakope Indonesia*, Edisi III. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes RI. 1995. *Farmakope Indonesia*, Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dewi, K.H . Zuki, M. dan Subagio, M. 2012. *Kajian Suhu dan Lama Waktu Penyangraian Nibs Terhadap Mutu Bubuk Coklat* . Universitas Bengkulu, Vol.2 , No.1, 42-47 .
- E. Rudolph., A. Färbing., & J. König. 2012. *Determination of the caffeine contents of various food items within the Austrian market and validation of a caffeine assessment tool (CAT)*. Department of Nutritional Sciences , University of Vienna , Althanstraße 14, A-1090 Vienna , Austria.
- E.O, Afoakwa. 2010. *Chocolate Science And Technology*. 1th Edition. Oxford-United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Faiz, Zulkifli., Sulisty Mulyo Agustini., Annisa' Hasanah. 2016. *Pengaruh Ekstrak Biji Coklat (Theobroma Cacao L) Terhadap Kadar Malondialdehid (Mda) Tikus Putih Jantan (Rattus Norvegicus Strain Wistar) Dengan Induksi Hiperkolesterol*. Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Malang. Volume 12. No 1 juni 2016.

- Fajriana, Nur Hasani, Imelda Fajriati. 2018. Analisis Kadar Kafein Kopi Arabika (*Coffea Arabica* L.) Pada Variasi Temperatur Sangrai Secara Spektrofotometri Ultra Violet. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga Yogyakarta. Volume 3, No. 02. E-ISSN 2540-8267.
- H.N, Wanyika, E. G. Gatebe, L. M. Gitu, E. K. Ngumba and C. W. Maritim. 2010. *Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market*. African Journal of Food Science Vol. 4(6), pp. 353 – 358, June 2010. ISSN 1996-0794.
- Harvey. 2000. *Modern Analytical Chemistry*. North America : McGraw-Hill.
- Herlambang., Mulyono, Trajanus L. Jembise. 2018. *Hubungan Kebiasaan Minum Teh Terhadap Kejadian Gout Arthritis Pada Warga Jamaah Masjid Al Manshuurin Yabansai, Waena Jayapura*. Jurnal Biologi Papua ISSN: 2086-3314 Vol 10, No 2, Halaman: 56–61 E-ISSN: 2503-0450.
- Herlinda, R . Maulana, I.T . dan Sadiyah, E.R . 2016. *Kandungan Komponen Asam Lemak Biji Kakao (Theobroma Cacao L.) Hasil Fermentasi dan Non Fermentasi* . Universitas Islam Bandung , Vol.2 , No.1, 23.
- Hermawati, Eka, Enny Probosari. 2015. *Hubungan Asupan Kafein Dengan Kadar Asam Urat Di Puskesmas Banjarnegara*. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Journal Of Nutrition Collage Vol.4, No. 2.
- Juniarsana dan Wiardani. 2012. *Hubungan Kebiasaan Minum Kopi Dan Merokok Terhadap Kejadian Osteoporosis Pada Lansia Di Denpasar*. Jurnal Ilmu Gizi, Volume 3 No.1, 38 – 44.
- Kar, A. 2005. *Pharmaceutical Drug Analysis*. New Age Publications. India. p. 454, 462.
- M.A. Rostagno., N. Manchona., M. D'Arrigo., E. Guillamon., A. Villares., A., Garcia-Lafuente., A. Ramos., J.A. Martinez. 2011. *Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column*. Analytica Chimica Acta 685 p. 204–211.
- Maramis, R. K. 2013. *Analisis kafein dalam kopi bubuk di Kota Manado menggunakan spektrofotometri UV VIS*. Pharmacon, 2.

- Nour, Violeta., Ion Trandafir., Mira Elena Ionică. 2010. *Chromatographic Determination Of Caffeine Contents In Soft And Energy Drinks Available On The Romanian Market*. ISSN 1582-540X.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi Untuk Analisis Obat*. Graha ilmu : Yogyakarta. P.111, 113, 115.
- Orru M, Guitart X, Karcz KM, Solinas M, Justinova Z, Barodia SK, et al. 2013. *Psychostimulant pharmacological profile of paraxanthine, The main metabolite of caffeine in humans*. *Neuropharmacology*; 67: 476-84.
- Rahmawati, Rita, Dian Daniyati. 2016. *Hubungan Kebiasaan Minum Kopi Terhadap Tingkat Hipertensi (Correlation Habit of Drinking Coffee to the Level of Hypertension)*. Gresik : Jurnal Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Gresik. Vol. 07, No. 02.
- Ratnasari, Dewi, Sugeng Maryanto, Meilita Dwi Paundrianagari. 2015. *Hubungan Kebiasaan Konsumsi Kopi Dan Aktivitas Fisik Dengan Kejadian Hipertensi Pada Laki-Laki Usia 35–50 Tahun Di Wilayah Kerja Puskesmas Teruwai Kecamatan Pujut Kabupaten Lombok Tengah*. JGK-vol.7, no.13.
- Roosenda, Kurnia., dan Drs. Sunarti, M.si. 2016. *Efektivitas Pelarut pada ekstraksi dan Penentuan Kafein dalam Minuman Ringan Khas Daerah menggunakan Spektrofotometri UV-Vis*. Yogyakarta: Jurnal Kimia Universitas Negeri Yogyakarta.
- Rouessac, F. dan Rouessac, A. 2007. *Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques*. 2nd edition. John Wiley & Sons: England.
- Skoog, Douglas, A. 2004. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Edisi VIII. Canada: Brooks/Cole.
- Soemantri, R. 2011. *Kisah dan khasiat teh*. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Sudiby, Agus. 2012. *Peran Coklat Sebagai Produk Pangan Derivat Kakao Yang Menyehatkan*. *Jurnal Riset Industri*. Vol. VI No. 1. 23-40.

- Sugiyono, 2013. *Metodelogi Penelitian Kuantitatif, Kualitatif Dan R&D*. Bandung: ALFABETA.
- Sujarweni, V.Wiratna. 2012. *SPSS Untuk Paramedis*. Cetakan I. 131-136. Gavamedia. Yogyakarta.
- Suwarto, Yuke Octavianty & Silvia Hermawati. 2014. *Top 15 Tanaman Perkebunan*, Cetakan I, 38-40, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Tjay, T.H dan Rahardja, K. 2007. *Obat-obat penting, khasiat, penggunaan, dan efek-efek sampingnya (edisi IV)*, Cetakan I, 373-374, PT Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Trihendradi, C. 2013. *Langkah Praktis Menguasai Statistik*. CV Andi Offset. Yogyakarta.
- Tsalis Nugraheni Fatma, Melani Dewi, Ria Septiyana. 2017. *Perbandingan Rendemen Kristal Kafein pada Biji Kopi (Coffea arabica l.) dan Coklat (Theobroma cacao l.) dengan Menggunakan Metode Refluks*. Vol. 1, No. 1, November 2017. P-ISSN 2559 – 2163 E-ISSN 2599 – 2155.
- Wijayanti, Devita dan Thorikul Huda. 2017. *Penentuan Ketidakpastian Pengukuran Kadar Kafein pada Biji Kakao (Theobroma Cacao L.) Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis*. Journal Cis-Trans (JC-T) Volume 1, Nomor 2, Desember 2017, e-ISSN 2549-6573.

Lampiran 1. Perhitungan Pembuatan Larutan Standar

Perhitungan pembuatan Larutan Standar

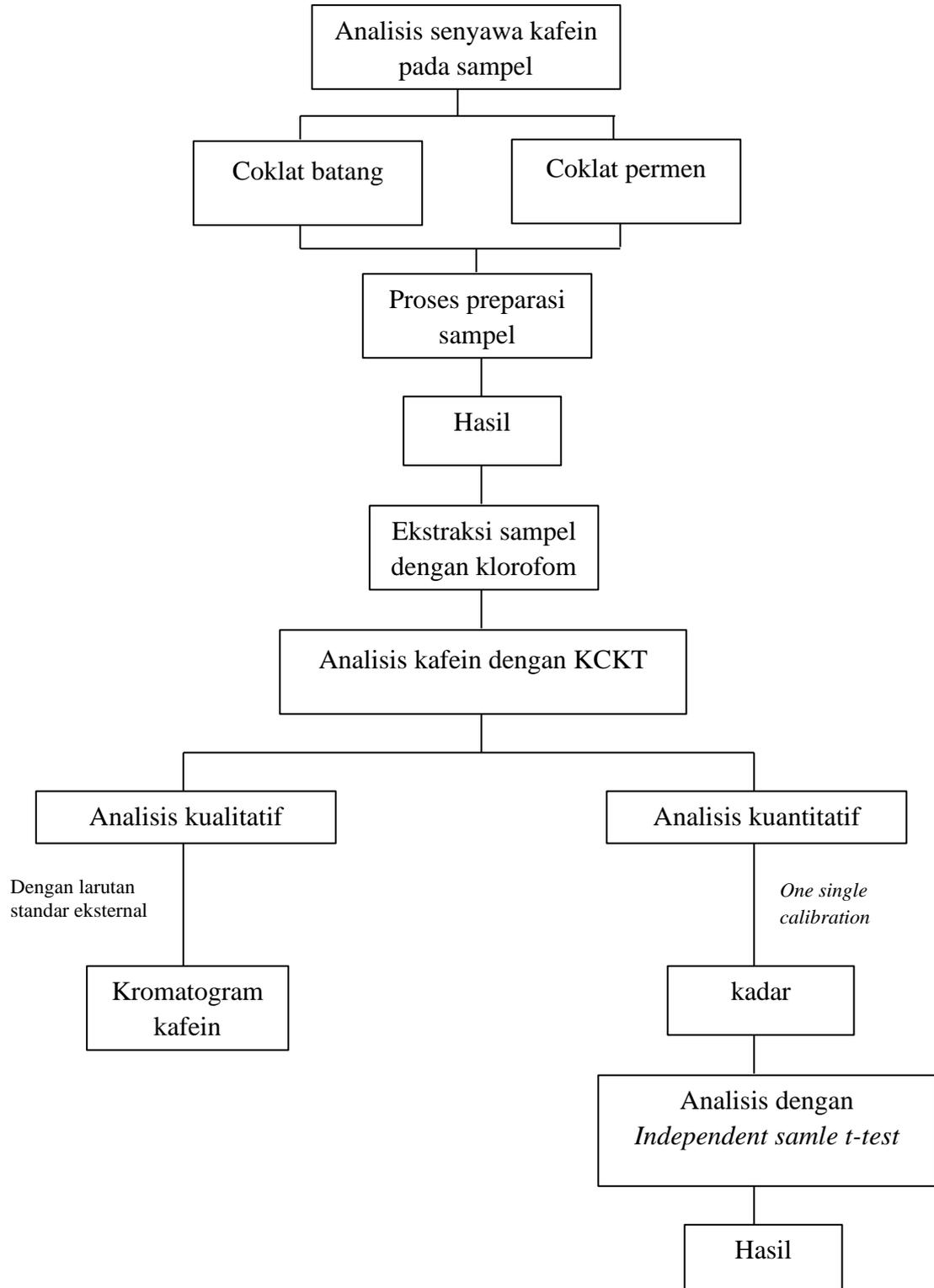
Larutan standar dibuat 100 ppm

$$100 \text{ ppm} = \frac{10\text{mg}}{100\text{ml}}$$

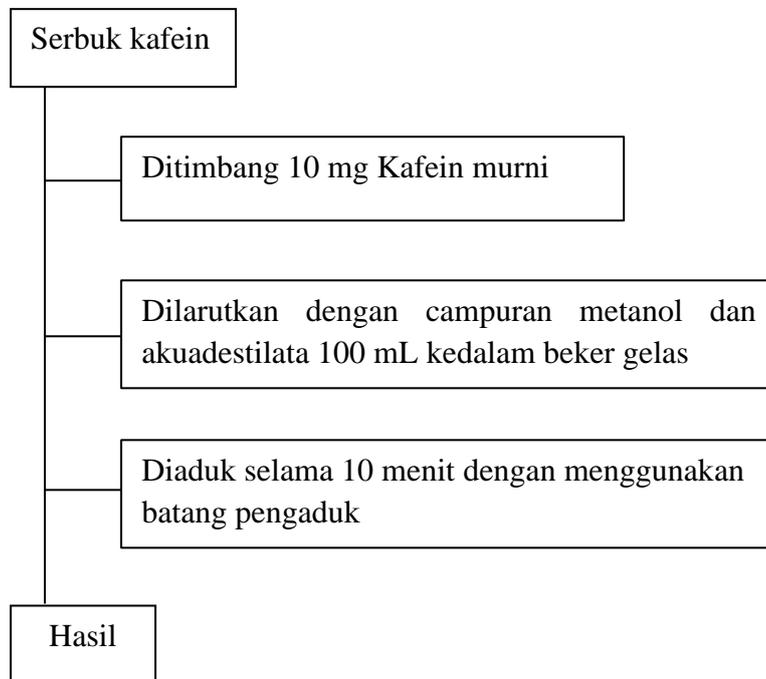
Kafein Standar dibuat dengan 10 mg sampel

$$\text{Larutan standar yang dibuat 100 ppm} = \frac{10\text{mg}}{100\text{mL}} = \frac{10\text{mg}}{0,100 \text{ L}}$$

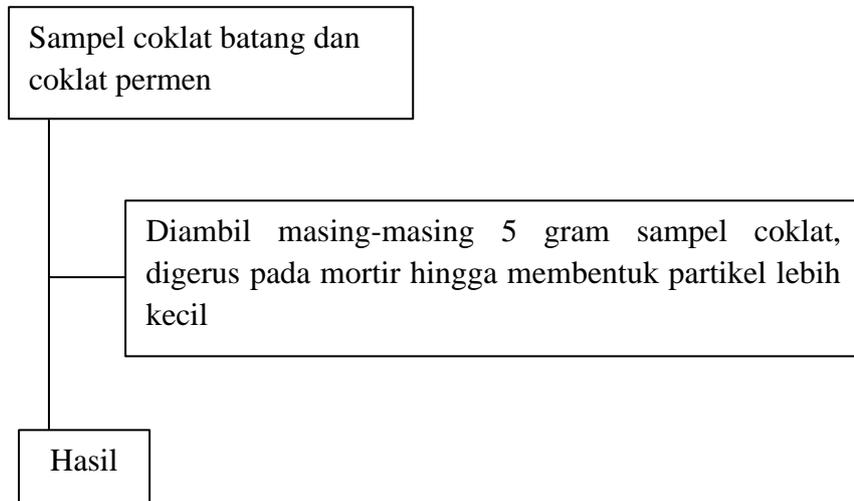
Lampiran 2. Rancangan penelitian



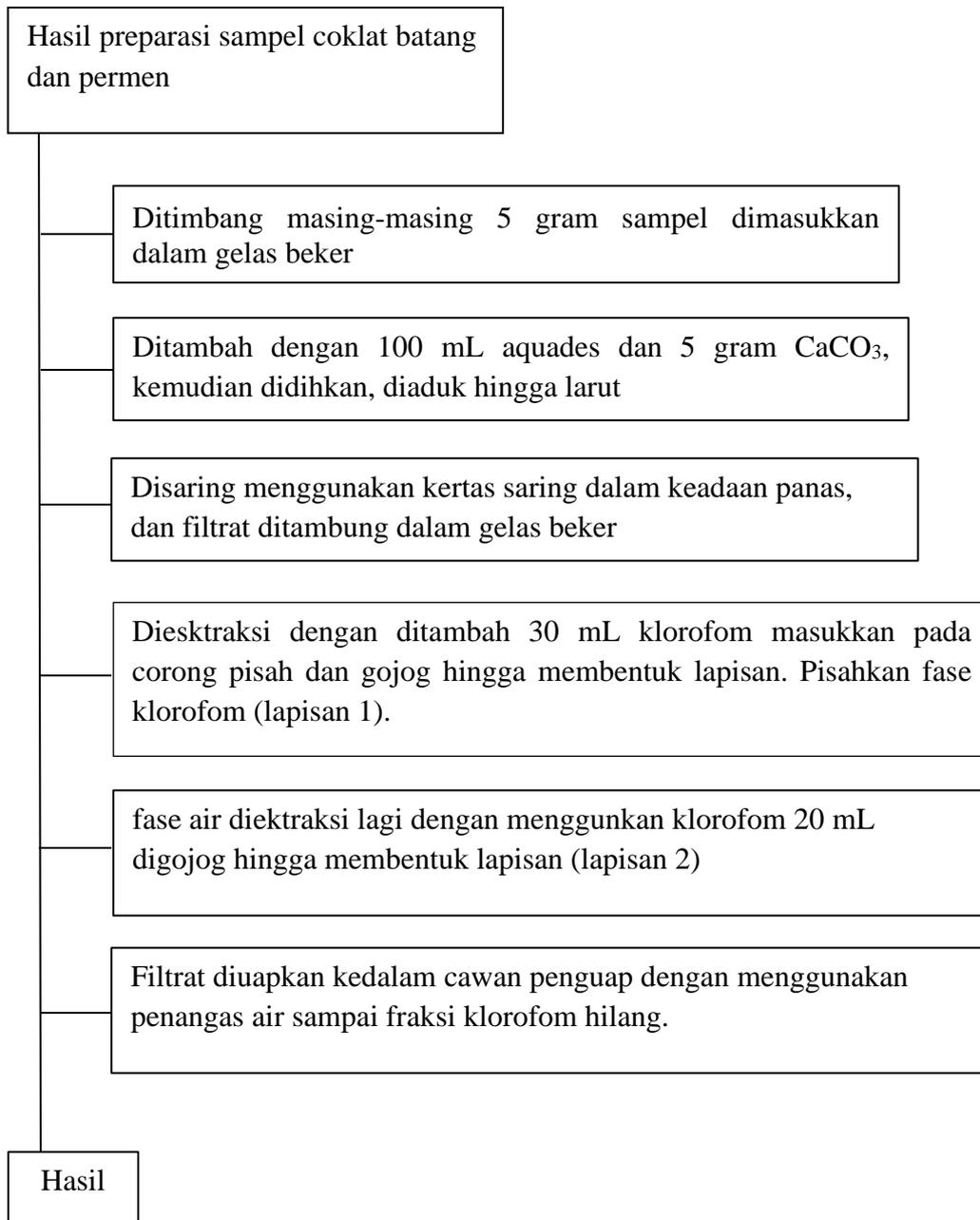
Lampiran 3. Skema Kerja Pembuatan Larutan Standar



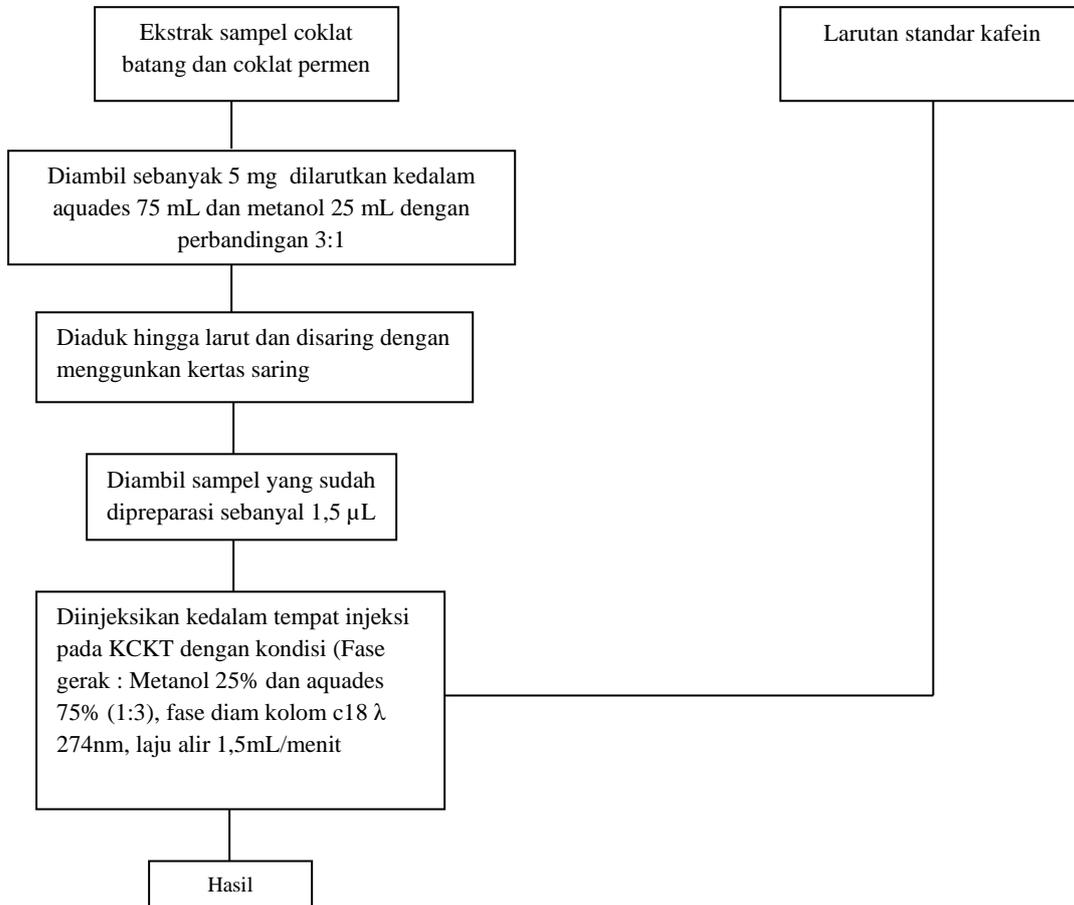
Lampiran 4 : Skema kerja preparasi sampel



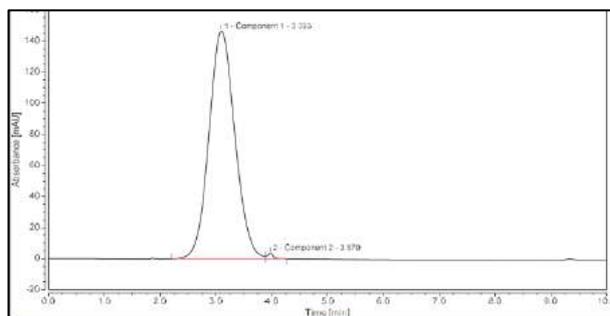
Lampiran 5 : Ekstraksi senyawa kafein pada sampel



Lampiran 6. Analisis kualitatif senyawa kafein (metode standar eksternal)

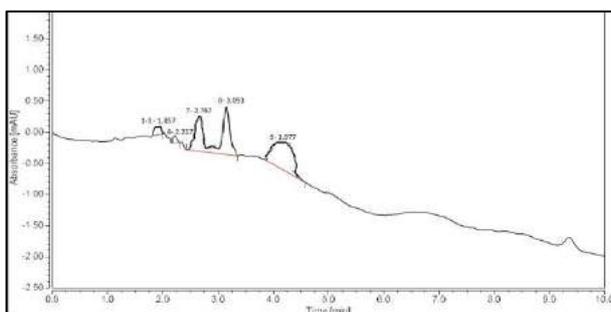


1. Hasil analisis kualitatif standar kafein



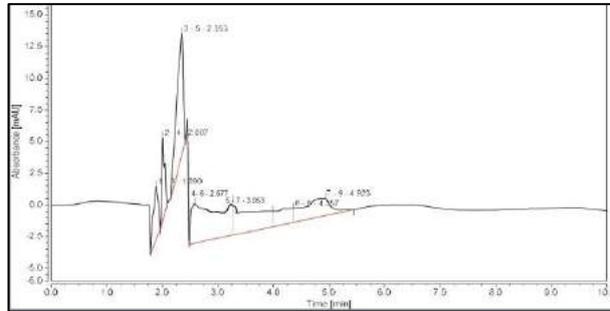
No.	Peak Name	Retention Time (min)	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
n.a	1	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	2	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	3	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	4	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	5	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	6	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
1	Component 1	3.093	78.969	146.613	99.45	97.32	n.a
2	Component 2	3.970	0.436	4.040	0.55	2.68	n.a
n.a	8	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	9	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	10	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Total			79.405	150.653	100.00	100.00	

2. Hasil analisis kualitatif sampel coklat batang



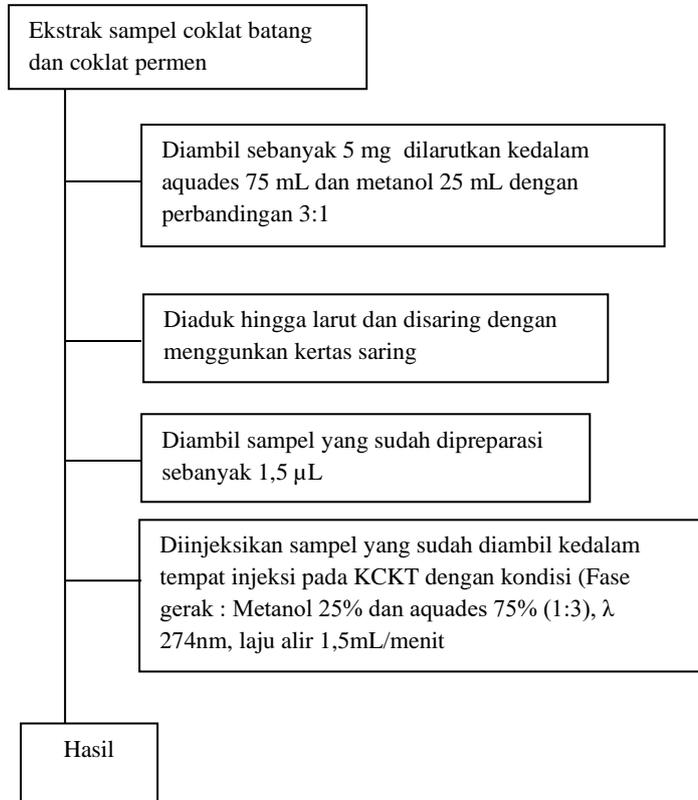
No.	Peak Name	Retention Time (min)	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
n.a	1	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	2	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
1	3	1.857	0.100	1.451	20.32	45.41	n.a
n.a	4	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
2	Component 1	2.217	0.010	0.126	2.00	3.95	n.a
n.a	5	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	6	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
3	7	2.767	0.126	0.494	25.49	15.45	n.a
4	Component 2	3.093	0.151	0.358	30.64	11.20	n.a
5	Component 3	3.977	0.106	0.767	21.54	23.99	n.a
n.a	8	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	9	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	10	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Total			0.494	3.196	100.0	100.0	

3. Hasil analisis kualitatif sampel coklat permen

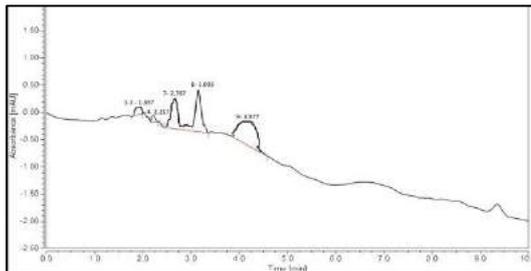


No.	Peak Name	Retention Time (min)	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
n.a	1	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	2	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
1	Component 1	1.890	0.473	4.196	7.37	14.74	n.a
2	Component 2	2.007	0.370	6.567	5.76	23.07	n.a
3	Component 3	2.353	1.385	9.561	21.55	33.59	n.a
4	Component 4	2.577	0.768	3.160	11.95	11.10	n.a
5	Component 5	3.053	2.106	2.501	32.77	8.78	n.a
6	Component 6	4.357	0.463	1.114	6.79	3.91	n.a
7	Component 7	4.923	0.887	1.367	13.80	4.80	n.a
n.a	3	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Total			6.425	28.466	100.00	100.00	

Lampiran 7 : Analisis kuantitatif kafein dengan menggunakan KCKT



Hasil analisis kuantitatif sampel coklat batang



Sampel	No peak	Luas area (mAu)	Retensi waktu (menit)
Coklat Batang	1	0,010	2,217
	2	0,151	3,093
	3	0,106	3,977

Perhitungan persentase kadar kafein pada coklat batang

Diketahui luas area = 0,151

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Kadar kafein dalam coklat batang} &= \frac{\text{luas area senyawa}}{\Sigma \text{ luas area}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,151}{0,494} \times 100 \% \\
 &= 30,64 \%
 \end{aligned}$$

Perhitungan kadar kafein (mg/5g coklat)

Menurut USDA kandungan kafein dalam coklat sebesar 800mg/100g coklat, dari data tersebut dapat digunakan untuk mencari kadar total kafein dalam 5g coklat

$$\frac{800mg}{100g} = \frac{x}{5g}$$

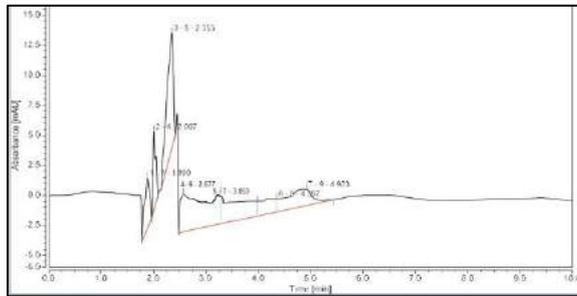
$$100g \times x = 800mg \times 5g$$

$$x = 40mg$$

Kadar kafein (mg/5g)

$$\begin{aligned} \text{Coklat batang} &: \frac{30,64\%}{100\%} \times 40 \text{ mg} \\ &= 12,25 \text{ mg} \end{aligned}$$

Hasil analisis kuantitatif sampel coklat permen



Sampel	No puncak	Luas area (mAU)	Waktu retensi (menit)
Coklat Permen	1	0,370	2,007
	2	0,768	2,577
	3	2,106	3.053

Perhitungan presentase kadar kafein pada coklat permen

Diketahui luas area = 2,106

$$\begin{aligned} \% \text{ Kadar kafein dalam coklat batang} &= \frac{\text{luas area senyawa}}{\Sigma \text{ luas area}} \times 100\% \\ &= \frac{2,106}{6,425} \times 100\% \\ &= 32,77\% \end{aligned}$$

Perhitungan kadar kafein (mg/5g coklat)

Menurut USDA kandungan kafein dalam coklat sebesar 800mg/100g coklat, dari data tersebut dapat digunakan untuk mencari kadar total kafein dalam 5g coklat

$$\frac{800mg}{100g} = \frac{x}{5g}$$

$$100g \times x = 800mg \times 5g$$

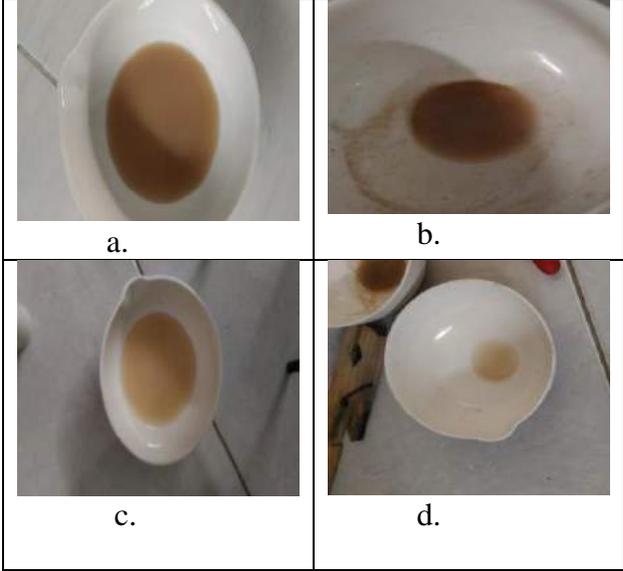
$$x = 40mg$$

Kadar kafein (mg/5g)

$$\begin{aligned} \text{Coklat permen} &: \frac{32,77\%}{100\%} \times 40 \text{ mg} \\ &= 13,10 \text{ mg} \end{aligned}$$

Lampiran 8 : Gambar proses analisis senyawa kafein dalam sampel coklat

1. Proses Ekstraksi Sampel

No	Gambar	Keterangan
1		<p>Sampel coklat sebanyak 5 gram ditambah dengan CaCO_3 5 gram dan ditambah akuadestilata 100 mL. Selanjutnya dilakukan Pemanasan sampel untuk melarutkan semua sampel</p> <p>Ket :</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Coklat batang b. Coklat permen
2		<p>Penyaringan sampel dengan menggunakan kertas saring</p> <p>Ket :</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Coklat batang b. Coklat permen
3		<p>Hasil ekstraksi sebelum dan sesudah</p> <p>Ket :</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Sampel coklat batang sebelum ekstraksi. b. Sampel coklat batang setelah ekstraksi. c. Sampel coklat permen sebelum ekstraksi. d. Sampel coklat permen setelah ekstraksi

4	 <p style="text-align: center;">a. b.</p>	<p>Ket :</p> <p>a. Sampel Coklat batang yang telah dilarutkan dengan akuadestilata dan metanol.</p> <p>b. Sampel Coklat Permen yang telah dilarutkan dengan akuadestilata dan metanol.</p>
---	---	--

2. Pembuatan Larutan Standar

Gambar	Keterangan
	<p>Standar Kafein dibuat dengan konsentrasi 100ppm dengan menimbang 10 mg kafein dilarutkan dengan 25 mL Metanol dan 75 mL akuadestilata panas</p>

3. Penetapan Kadar Kafein dengan KCKT

	<p>Sampel dan larutan standar dimasukkan kedalam tabung, lalu dilanjutkan dengan proses analisis</p>
---	--

Lampiran 9 : Data hasil analisis uji kualitatif kafein dengan KCKT

Kode gambar	Sampel	No puncak	Luas area (mAU)	Waktu retensi (menit)
a	Standar Kafein	1	78,969	3,093
b	Coklat Batang	1	0,010	2,217
		2	0,151	3,093
		3	0,106	3,977
c	Coklat Permen	1	0,370	2,007
		2	0,768	2,577
		3	2,106	3.053

Lampiran 10. Analisis statistika perbedaan kadar coklat batang dan permen

		Group Statistics			
	JENIS_CKT	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KADAR	BATANG	3	12.2600	.01000	.00577
	PERMEN	3	13.1033	.00577	.00333

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
KADAR	Equal variances assumed	.400	.561	-126.500	4	.000	-.84333	.00667	-.86184	-.82482
	Equal variances not assumed			-126.500	3.200	.000	-.84333	.00667	-.86382	-.82285

Lampiran 11. Jadwal Penelitian

JADWAL KEGIATAN		Bulan ke-					TEMPAT
		2	3	4	5	7	
1.	Tahap Persiapan						
	a.	Persiapan Bahan	√				Laboratorium Kimia KPB
2.	Tahap Penelitian						
	a.	Preparasi Sampel		√			Laboratorium Kimia KPB
	b.	Ekstraksi Sampel		√			Laboratorium Kimia KPB
	c.	Analisis dengan KCKT			√		Ruang Instrumentasi KCKT UIN malang
3.	Tahap Penyelesaian						
	a.	Analisis dan Pengolahan Data				√	Laboratorium Kimia KPB
	b.	Penyusunan Laporan Akhir				√	Laboratorium Kimia KPB
	c.	Pengumpulan Laporan				√	Prodi S1 Farmasi KPB