

LAPORAN TUGAS AKHIR

**VALIDASI METODE UJI KAFEIN DALAM MINUMAN KOPI
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI (KCKT) DI PT SARASWANTI INDO GENETECH
BOGOR**

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh derajat Ahli
Madya Sains (A.Md.Si) Analisis Kimia Program Studi D III Analisis Kimia**



Disusun oleh :

Lilis Listyaningrum

NIM : 17231087

**PROGRAM STUDI DIPLOMA III ANALISIS KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
2020**

LAPORAN TUGAS AKHIR

**VALIDASI METODE UJI KAFEIN DALAM MINUMAN KOPI
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI (KCKT) DI PT SARASWANTI INDO GENETECH
BOGOR**

**METHOD VALIDATION OF CAFFEINE TEST IN COFFEE DRINK
USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)
AT PT SARASWANTI INDO GENETECH BOGOR**



Disusun oleh :

Lilis Listyaningrum

NIM : 17231087

**PROGRAM STUDI DIPLOMA III ANALISIS KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
2020**

**HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN TUGAS AKHIR**

**VALIDASI METODE UJI KAFEIN DALAM MINUMAN KOPI
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI (KCKT) DI PT SARASWANTI INDO GENETECH
BOGOR**

Dipersiapkan dan disusun oleh :


Lilis Listyaningrum
NIM : 17231087

Telah disetujui oleh Dosen Pembimbing Tugas Akhir
Program Studi D III Analisis Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia
pada tanggal 18 Agustus 2020

Mengetujui :

Kaprodi D III Analisis Kimia

Pembimbing



Tri Esti Purbaningtias, S.Si., M.Si

NIK.132311102



Kuntari, M.Sc.

NIK. 162310401

**HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN TUGAS AKHIR**

**VALIDASI METODE UJI KAFEIN DALAM MINUMAN KOPI
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI (KCKT) DI PT SARASWANTI INDO GENETECH
BOGOR**

Dipersiapkan dan disusun oleh :

**Lilis Listyaningrum
NIM : 17231087**

Telah dipertahankan didepan Tim Penguji pada tanggal 18 Agustus 2020

Susunan Tim Penguji

Pembimbing / Penguji



**Kuntari, M.Sc.
NIK. 162310401**

Penguji I



**Puji Kurniawati, S.Pd.Si., M.Sc.
NIK. 132311103**

Penguji II



**Tri Esti Purbaningtias, S.Si., M.Si.
NIK. 132311102**

**Mengetahui,
Dekan FMIPA UII**



**Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D.
NIK. 006120101**

HALAMAN PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa laporan tugas akhir yang berjudul “VALIDASI METODE UJI KAFEIN DALAM MINUMAN KOPI MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT) DI PT SARASWANTI INDO GENETECH BOGOR” ini tidak terdapat bagian yang pernah dipergunakan untuk publikasi sebelumnya dan sepengetahuan saya tidak terdapat bagian yang pernah ditulis dan diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka di bagian akhir laporan ini. Saya mempersilahkan sebagian pengutip karya ini sebagai materi praktikum setelah penerbitan karya ini.



Yogyakarta, 18 Agustus 2020



Lilis Listyaningrum

MOTTO

“ Sesungguhnya sesudah kesulitan pasti ada kemudahan “

(Al-Insyirah [94]: 6)

*“Jangan berhenti berharap dan berencana karena Allah sebaik-baiknya
perencana”*

*“Hanya pendidikan yang bisa menyelamatkan masa depan, tanpa pendidikan
Indonesia tak mungkin bertahan”*

(Najwa Shihab)



HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobil'alamin

Dengan rahmat Allah yang maha pengasih lagi maha penyayang yang telah memberi kekuatan serta kelancaran dalam proses penyusunan. Segala pujian sholawat dan salam terlimpahkan pada Rosulullah Muhammad SAW.

Bapak, ibu dan kakak-kakak ku tercinta

Saya ucapkan terimakasih kepada bapak, ibu dan kakak-kakak ku tercinta yang tiada hingga telah memberikan segalanya, kasih sayang, dukungan moril maupun materil dan do'a yang selalu di panjatkan serta menjadi penyemangat dalam penyusunan laporan.

Dosen Analisis Kimia beserta staff

Terimakasih atas segala ilmu dan pengalamannya selama ini terimakasih telah memberikan pembelajaran sehingga banyak ilmu yang dapat saya aplikasikan selama PKL, terutama ibu Kuntari M.Sc. selaku dosen pembimbing PKL yang telah memberikan saran agar penyusunan laporan PKL ini berjalan dengan baik.

Teman-teman D III Analisis Kimia angkatan 17

Terimakasih telah menemani berjuang dikelas, maupun di laboratorium dan saling memberi semangat saat penyusunan laporan.

Karyawan dan Staf di PT Saraswanti Indo Genetech

Terimakasih atas bantuan, bimbingan, nasehat, kebaikan, serta kenang-kenangan manis yang tidak pernah terlupakan.

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur atas Kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayahnya kepada saya sehingga dapat menyelesaikan Laporan Tugas Akhir tentang Validasi Metode Uji Kafein dalam Minuman Kopi menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi di PT Saraswanti Indo Genetech yang berlokasi di Bogor Barat ini dengan baik meskipun didalamnya masih jauh dari kata sempurna. Sholawat serta salam selalu tercurahkan kepada Rasulullah S.A.W. Laporan Tugas Akhir ini merupakan salah satu persyaratan yang harus dipenuhi untuk dapat memperoleh gelar Ahli Madya (A.Md.Si) Di Progrma Studi Diploma III Analisis Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia Yogyakarta. Proses penyusunan laporan ini tidak akan berhasil tanpa bantuan, dukungan dan bimbingan serta arahan dari berbagai pihak. Dengan demikian pada kesempatan ini penyusun mengucapkan terimakasih kepada :

1. Prof. Riyanto.,Ph.D selaku Dekan Fakultas MIPA UII.
2. Tri Esti Purbaningtias, M.Si selaku Ketua Program Studi D III Analisis Kimia.
3. Kuntari, S.Si., M.Sc selaku Pembimbing I yang telah memberikan saran, pendapat, masukan dan petunjuk serta ilmu yang bermanfaat bagi penulis dalam menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan.
4. Shenna Ayuningtyas selaku Pembimbing II yang telah memberikan saran dan bimbingan selama Praktik Kerja Lapangan Laboratorium R&D PT Saraswanti Indo Genetech Bogor.
5. Pimpinan HRD PT Saraswanti Indo Genetech atas kesempatan yang telah diberikan untuk dapat melaksanakan Praktik Kerja Lapangan .
6. Karyawan dan Staf di PT Saraswanti Indo Genetech atas bantuan, bimbingan, nasehat, kebaikan, serta kenang-kenangan manis yang tidak pernah terlupakan.

7. Bapak, ibu, kakakku Indra purnama dan Ivan dwi saputra yang selalu menguatkan, memberikan dukungan moril maupun materil dan do'a yang selalu di panjatkan serta menjadi penyemangat dalam penyusunan laporan.
8. Teman-teman D III Analisis Kimia angkatan 17 yang telah memberikan bantuan selama proses perkuliahan dan semua kenangan indahny selama 3 tahun.

Penulis menyadari bahwa dengan keterbatasan yang dimiliki, laporan ini jauh dari kata sempurna, untuk itu kritik dan saran yang membangun penulis harapkan untuk sempurnanya laporan ini. Akhir kata, mohon maaf atas kekurangan laporan ini, semoga dapat memberikan manfaat bagi penulis maupun bagi para pembaca.



Yogyakarta, 18 Agustus 2020

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|--|------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iv |
| MOTTO | v |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | vi |
| KATA PENGANTAR | vii |
| DAFTAR ISI..... | ix |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR TABEL..... | xiii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xiv |
| INTISARI..... | xv |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 3 |
| 1.3. Tujuan..... | 3 |
| 1.4. Manfaat..... | 3 |
| BAB II DASAR TEORI | 5 |
| 2.1 Profil PT Saraswanti Indo Genetech..... | 5 |
| 2.2 Minuman Kopi Kemasan..... | 6 |
| 2.3 Kafein..... | 9 |
| 2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)..... | 10 |
| 2.5 Analisis Kafein menggunakan KCKT..... | 14 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6 Uji Kesesuaian Sistem (UKS)..... | 15 |
| 2.6.1 Presisi..... | 15 |
| 2.6.2 Faktor <i>tailing</i> | 15 |
| 2.6.3 Resolusi (daya pisah)..... | 16 |
| 2.6.4 Jumlah plat teoritis..... | 16 |
| 2.7 Validasi Metode..... | 17 |
| 2.7.1 Linieritas | 18 |
| 2.7.2 <i>Limit of Detection (LOD)</i> dan <i>Limit of Quantification (LOQ)</i> | 19 |
| 2.7.3 Presisi..... | 19 |
| 2.7.4 Akurasi..... | 21 |
| 2.7.5 <i>Robustness (Ketegaran)</i> | 22 |
| 2.7.6 Estimasi Ketidakpastian..... | 23 |
| BAB III METODOLOGI PENELITIAN..... | 25 |
| 3.1. Alat..... | 25 |
| 3.2. Bahan..... | 25 |
| 3.3. Prosedur Kerja..... | 25 |
| 3.3.1. Pembuatan larutan..... | 25 |
| 3.3.2. Optimasi alat KCKT | 26 |
| 3.3.3. Pembuatan deret standar | 26 |
| 3.3.4. Preparasi sampel | 27 |
| 3.3.5 Uji kesesuaian sistem (UKS) | 27 |
| 3.3.6. Uji spesifitas. | 27 |
| 3.3.7. Uji <i>limit of detection (LOD)</i> dan <i>limit of quantification (LOQ)</i> | 28 |
| 3.3.8. Uji linieritas dan residual kurva..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 3.3.9. Uji akurasi..... | 29 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 32 |
| 4.1. Uji Kesesuaian Sistem (UKS) | 32 |
| 4.1.1. Presisi..... | 32 |
| 4.1.2. Resolusi..... | 33 |
| 4.1.3. Faktor <i>Tailing</i> (T) | 33 |
| 4.1.4. <i>Theoretical Plate</i> (N)..... | 33 |
| 4.2. Validasi Metode..... | 34 |
| 4.2.1. Penentuan Linieritas | 34 |
| 4.2.2. <i>Limit of Detection</i> (LOD) dan <i>Limit of Quantification</i> (LOQ) | 37 |
| 4.2.3. Penentuan Spesifitas (Selektivitas)..... | 40 |
| 4.2.4. Penentuan Presisi (Keseksamaan) | 41 |
| 4.2.5. Penentuan <i>Robustness</i> Volume Sampel (Ketegaran)..... | 43 |
| 4.2.6. Penentuan Akurasi (Kecermatan)..... | 46 |
| 4.3.7. Estimasi Ketidakpastian..... | 47 |
| BAB V PENUTUP..... | 50 |
| 5.1. Kesimpulan..... | 50 |
| 5.2. Saran..... | 51 |
| DAFTAR PUSTAKA | 52 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar 2. 1 Struktur Kafein..... | 9 |
| Gambar 2. 2 Diagram Alat dan Komponen KCKT | 11 |
| Gambar 4. 1 Kurva Kalibrasi Batas Linieritas..... | 35 |
| Gambar 4. 2 Kurva Kalibrasi Linieritas..... | 36 |
| Gambar 4. 3 Diagram Tulang Ikan Kadar Kafein..... | 47 |
| Gambar 4. 4 % Kontribusi Ketidakpastian..... | 49 |

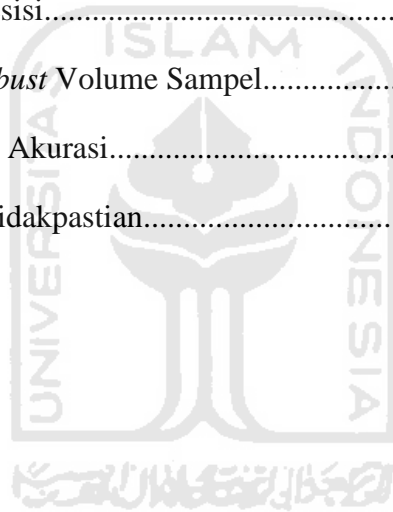


DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 2. 1 Syarat Mutu Minuman Kopi dalam Kemasan..... | 7 |
| Tabel 2. 2 Range Penerimaan <i>Recovery</i> Hasil Uji | 22 |
| Tabel 3. 1 Deret Standar Kafein..... | 26 |
| Tabel 4. 1 Hasil Uji Kesesuaian Sistem..... | 32 |
| Tabel 4. 2 Luas Area Standar Kafein | 36 |
| Tabel 4. 3 <i>Limit Detection Instrumen</i> (LDI) | 38 |
| Tabel 4. 4 LDI Pengulangan 10 kali | 38 |
| Tabel 4. 5 <i>Limit of Detection</i> (LOD) dan <i>Limit of Quantification</i> (LOQ) Teoritis | 39 |
| Tabel 4. 6 <i>Limit of Detection</i> (LOD) dan <i>Limit of Quantification</i> (LOQ) Praktik | 39 |
| Tabel 4. 7 Hasil Analisis Spesifitas | 41 |
| Tabel 4. 8 Hasil Analisis Presisi | 42 |
| Tabel 4. 9 Hasil Analisis <i>Robustness</i> Volume Sampel 1 mL..... | 43 |
| Tabel 4. 10 Hasil Analisis <i>Robustness</i> Volume Sampel 3 mL..... | 43 |
| Tabel 4. 11 Hasil Analisis <i>Robustness</i> Volume Sampel 5 mL..... | 44 |
| Tabel 4. 12 Uji T <i>Robustness</i> Volume Sampel 3 mL dan 1 mL | 45 |
| Tabel 4. 13 Uji T <i>Robustness</i> Volume Sampel 3 mL dan 5 mL | 45 |
| Tabel 4. 14 Standar Adisi Konsentrasi 80%, 100%, dan 120% | 46 |
| Tabel 4. 15 Estimasi Ketidakpastian Baku Penentuan Kadar Kafein | 48 |
| Tabel 4. 16 Kontribusi Ketidakpastian Pengukuran | 48 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| Lampiran 1 Pembuatan Larutan..... | 56 |
| Lampiran 2 Penentuan UKS | 57 |
| Lampiran 3 Penentuan Spesifitas (Selektivitas)..... | 58 |
| Lampiran 4 Penentuan Batas Linieritas..... | 59 |
| Lampiran 5 Penentuan Linieritas..... | 60 |
| Lampiran 6 Penentuan <i>Limit of Detection</i> (LOD) dan <i>Limit of Quantification</i> (LOQ)..... | 61 |
| Lampiran 7 Penentuan Presisi..... | 66 |
| Lampiran 8 Penentuan <i>Robust</i> Volume Sampel..... | 68 |
| Lampiran 9 Penentuan Uji Akurasi..... | 73 |
| Lampiran 10 Estimasi Ketidakpastian..... | 78 |



VALIDASI METODE UJI KAFEIN DALAM MINUMAN KOPI MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT) DI PT SARASWANTI INDO GENETECH BOGOR

Lilis Listyaningrum

Program Studi D III Analisis Kimia FMIPA Univertas Islam Indonesia
Jl. Kaliurang Km 14,5 Sleman-Yogyakarta

Email 17231087@students.uui.ac.id

INTISARI

Telah dilakukan uji kesesuaian sistem (UKS) dan validasi metode uji kafein dalam minuman kopi yang mengacu kepada SNI 2983:2004. Validasi kafein dalam minuman kopi ini perlu dilakukan validasi karena merupakan metode baku yang dimodifikasi, modifikasi dilakukan pada pengambilan jumlah sampel, pereaksi dan laju alir yang digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk memastikan unjuk kerja dari metode terbukti valid. Parameter yang ditentukan yaitu linieritas, LOD, LOQ, spesifitas, *robustnes*, presisi, akurasi dan ketidakpastian pengukuran. Sistem KCKT menggunakan detektor PDA pada panjang gelombang 272 nm dan laju alir 0,75 mL/menit, kolom yang digunakan yaitu *Reversed phase C 18* dengan volume injeksi 10 μ L pada suhu 35°C, serta jenis elusi isokratik. Hasil UKS untuk parameter %RSD luas area sebesar 0,95% dan *retention time* sebesar 0,5%, faktor *tailing* sebesar 1,58 dan *theoretical plate* sebesar 5428,53, keseluruhan parameter UKS memenuhi batas keberterimaan sehingga sistem KCKT dapat digunakan untuk pengujian. Hasil pengujian yang diperoleh menunjukkan metode dapat digunakan untuk pengujian rutin karena parameter yang ditentukan memenuhi syarat keberterimaan dengan linieritas $r = 0,9999$, LOD sebesar 0,34 mg/L dengan $S/N \geq 3$ dan LOQ sebesar 6,71 mg/L dengan $S/N \geq 10$. Spesifitas didapatkan resolusi $> 1,5$. *Robust* volume 1 mL, 3 mL, dan 5 mL secara berurutan didapatkan % RSD sebesar 0,89%, 0,92% dan 0,28% untuk meyakinkan apakah hasil *Robust* volume berbeda nyata atau tidak maka dilakukan uji t, nilai t hitung dari pemipetan sampel 3 mL dan 1 mL sebesar 1,851 dan t tabel sebesar 2,7764 untuk *robust* volume sampel 3 mL dan 5 mL nilai t hitung sebesar 1,533 dan t tabel sebesar 2,7764. Presisi didapatkan nilai %RSD analisis 1 sebesar 0,64% dan analisis 2 sebesar 0,99%. Akurasi metode didapatkan hasil % *recovery* pada *spike level* konsentrasi 80%, 100%, 120% secara berurutan yaitu 100,56 %, 99,97%, dan 100,37%. Ketidakpastian pengukuran didapatkan hasil $272,88 \pm 0,0073$.

Kata Kunci : Kafein, KCKT, Validasi Metode Uji Minuman Kopi.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi merupakan salah satu tanaman hasil perkebunan yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Minuman kopi banyak digemari oleh para penikmat kopi karena salah satu cara mudah dan praktis untuk menikmati kopi dibandingkan harus pergi ke kedai kopi. Kopi terkenal secara alami mengandung kafein yang tinggi. Kafein merupakan senyawa golongan *alkoloid* yang merupakan senyawa *trimethylxanthine*. Kafein dapat memberikan efek negatif apabila diserap oleh tubuh secara berlebihan. Batasan kafein yang aman untuk kesehatan adalah sebanyak 300 mg setiap harinya, setara dengan 3-4 cangkir kopi giling atau 5 cangkir kopi instan (Olivia, 2012). Minuman kopi kemasan mempunyai batasan kandungan kafein yang boleh terkandung didalamnya yaitu sebesar 200 mg/L (SNI 01-431314-1996, 1996). Kandungan kafein dalam suatu sampel dapat diketahui melalui pengujian dengan metode analisis yang telah tervalidasi. Metode analisis yang dapat digunakan untuk menentukan kandungan kafein dalam sampel adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Sistem KCKT dipilih untuk uji kafein dalam minuman kopi ini karena detektor yang dimiliki oleh KCKT dapat mengukur gugus kromofor dari senyawa kafein. Detektor yang digunakan yaitu *photodiode-array* (PDA), detektor jenis ini tepat untuk pengujian kafein karena mampu menghasilkan spektrum UV pada setiap puncaknya, kafein menghasilkan gugus kromofor. Kromofor merupakan suatu molekul atau bagian dari suatu molekul yang mengabsorpsi sinar di daerah UV-Vis (Suharti, 2017). Detektor *photodiode-array* (PDA) juga dapat memberikan kumpulan kromatogram dengan waktu yang hampir bersamaan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses, maka detektor PDA mampu memberikan lebih banyak informasi komposisi suatu sampel. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah pemisahan analit berdasarkan kepolarannya yang berlangsung di dalam fase diam yaitu kolom. Ketepatan dalam pemilihan kolom sangat berpengaruh terhadap kromatogram yang dihasilkan.

Kolom yang digunakan yaitu *reversed phase C 18* yang mempunyai fase diam bersifat non polar dan kafein merupakan senyawa yang bersifat polar. Senyawa-senyawa non polar yang terkandung dalam minuman kopi kemasan akan melekat lebih lama pada kolom yang sama-sama bersifat non polar, oleh karena itu senyawa kafein yang bersifat polar akan keluar lebih cepat melewati kolom yang kemudian akan dibaca oleh detektor.

Uji kesesuaian sistem (UKS) pada instrumen KCKT penting dilakukan dalam proses validasi metode sebelum pengujian sampel uji. Tujuannya untuk memastikan sistem kromatografi atau instrumen sudah berjalan dengan baik, efektif dan memberikan hasil analisis yang valid untuk pengujian. Komponen penentuan uji kesesuaian sistem meliputi presisi, faktor *tailing*, *resolusi* dan jumlah plat teoritis (Gandjar dan Rohman, 2007).

Metode uji kafein dalam minuman kopi ini perlu untuk dilakukan validasi karena merupakan metode baku yang dimodifikasi, validasi dilakukan untuk mengetahui hasil analisis yang didapatkan sesuai dengan tujuan dalam penggunaannya dan dapat dipertanggung jawabkan. Validasi uji kafein dalam minuman kopi mengacu kepada SNI 2983:2004. Acuan SNI yang digunakan yaitu SNI untuk kopi instan sedangkan penelitian ini yaitu minuman kopi. Perbedaannya terletak pada tekstur sampel, kopi instan memiliki tekstur sampel kering (serbuk) sedangkan minuman kopi dalam bentuk cairan, tentunya mengakibatkan pengambilan jumlah sampel berbeda, kopi instan sampel ditimbang sebanyak 0,5 g, untuk minuman kopi sampel dipipet sebanyak 3 mL. Modifikasi juga dilakukan pada pereaksi, pereaksi dari SNI kopi instan yaitu magnesium oksida (MGO) murni, untuk minuman kopi pereaksi diganti dengan Pb asetat 23% karena harganya yang lebih murah dan laju alir diturunkan menjadi 0,75 mL/menit dari 1,0 mL/menit. Parameter yang dipenuhi untuk validasi metode uji kafein dalam minuman kopi menggunakan KCKT yaitu linieritas, akurasi, *limit of detection* (LOD), *limit of quantification* (LOQ), selektivitas (spesifitas), presisi (ketelitian), *robustness* (kekuatan) yang dievaluasi dengan melakukan uji t dan ketidakpastian pengukuran.

Metode validasi uji kafein dalam minuman kopi ini yaitu dengan cara minuman kopi dilarutkan dalam akuabidest dan ditambahkan Pb asetat 23% untuk mengendapkan matriks lain selain kafein yang terkandung dalam minuman kopi. Larutan dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit untuk mengekstrak kafein dari dalam minuman kopi. Larutan disentrifuge dengan kecepatan 1400 rpm untuk memisahkan filtrat dan substrat. Larutan disaring menggunakan menggunakan minisart 0,45µm untuk mendapatkan filtrat dari larutan, kemudian larutan filtrat diinjeksikan ke dalam sistem KCKT pada panjang gelombang 272 nm.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah yang dikaji pada penelitian ini adalah :

1. Bagaimana hasil uji kesesuaian sistem (UKS) pada instrumen KCKT yang akan digunakan?
2. Apakah metode analisa yang digunakan pada validasi metode uji kafein dalam minuman kopi secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dapat memenuhi persyaratan keberterimaan dengan parameter spesifitas, LOD, LOQ, linieritas, presisi, akurasi, *robustness* volume sampel, dan ketidakpastian?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui hasil uji kesesuaian sistem (UKS) pada instrumen KCKT yang akan digunakan apakah sudah berjalan dengan baik, efektif dan memberikan hasil analisis yang valid untuk pengujian validasi uji kafein dalam minuman kopi .
2. Mengetahui unjuk kerja dari metode analisa validasi metode uji kafein dalam minuman kopi secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan parameter spesifitas, LOD, LOQ, linieritas, presisi, akurasi, *robustness* volume sampel, dan estimasi ketidakpastian ini terbukti valid.

1.4. Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai uji kesesuaian sistem (UKS) pada instrumen KCKT yang akan digunakan, apakah

sudah berjalan dengan baik, efektif dan memberikan hasil analisis yang valid untuk pengujian validasi uji kafein dalam minuman kopi dan metode analisis yang digunakan mampu mengidentifikasi secara valid dan akurat dengan tingkat kepercayaan yang tinggi sehingga mampu dipertanggung jawabkan, sehingga metode analisis uji kafein dalam minuman kopi secara KCKT ini dapat dijadikan sebagai metode analisis rutin di PT Saraswanti Indo Genetech Bogor.



BAB II

DASAR TEORI

2.1 Profil PT Saraswanti Indo Genetech

Perseroan Terbatas (PT) Saraswanti Indo Genetech Bogor berdiri pada tanggal 07 Juli 2001, merupakan kolaborasi antara dua PT yaitu PT Saraswanti Anugrah Makmur Surabaya dengan Indonesia *Center for Biodiversity and Biotechnology* (ICBB) Bogor, awalnya PT Saraswanti Indo Genetech hanya merupakan laboratorium jasa deteksi produk hasil rekayasa genetika atau GMO (*Genetically Modified Organism*) dan jasa identifikasi bakteri menggunakan PCR. Perseroan Terbatas (PT) Saraswanti Indo Genetech merupakan laboratorium jasa yang melayani uji keamanan pangan, kosmetik dan obat-obatan menggunakan mesin dan teknologi terbaik. Seperti uji mikrobiologi yang mengidentifikasi bakteri menggunakan PCR, deteksi produk hasil rekayasa genetika atau transgenik atau GMO (*Genetically Modified Organism*), uji vitamin, uji asam lemak, uji logam berat, uji residu, uji pestisida, uji proksimat, uji asam amino, uji tambahan pangan, uji *nutrition facts* dan uji lainnya, khusus untuk produksi makanan dan minuman (*Consumer goods*), proses yang dilakukan harus berdasarkan pada kaidah buku system HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) dan pengelolaan proses produksi yang baik.

Perseroan Terbatas (PT) Saraswanti Indo Genetech Bogor merupakan Laboratorium pengujian yang sudah resmi terekreditasi oleh Komite Akreditasi Nasional (KAN) berdasarkan ISO / EC 17025:2000 pada tanggal 10 Oktober 2003, dan merupakan laboratorium yang pertama kali terakreditasi oleh KAN dengan ruang lingkup produk rekayasa hasil genetika atau GMO (*Genetically Modified Organism*) secara kuantitatif maupun kualitatif. Tanggal 1 Maret 2003 PT Saraswanti Indo genetech telah lolos uji *Genetically Modified Organism* (GMO) yang diselenggarakan oleh FAPAS-GeMMA *Scheme Proficiency Testing Group, Central Science Laboratory, Sand Huttan York, United Kingdom* dengan predikat yang didapat yaitu “*Satisfactory performance*”, satu tahun berikutnya

pada tanggal 1 April 2004 PT Saraswanti Indo Genetech Bogor lolos uji Profisiensi GMO yang diselenggarakan oleh *Asia Pasific Laboratory Accreditation Cooperation* (APLAC) mendapatkan predikat “*Satisfactory Perfomance*”. Bulan Agustus 2006, PT Saraswanti Indo Genetech telah menempati gedung baru yang lebih representatif yaitu di jalan Rasamala No.46 Taman Yasmin, Bogor. Tanggal 8-9 Februari dilakukak reakreditasi ISO/IEC 17025:2007 dengan penambahan ruang lingkup yaitu uji vitamin, uji mikrobiologi, uji asam lemak, uji logam berat, dan uji lainnya. PT Saraswanti Indo genetech kembali melakukan reakreditasi ISO/IEIC 17025:2005 dengan penambahan ruang lingkup akreditasi yaitu uji pengawet makanan, uji residu pestisida, uji pemanis buatan, residu, melamin, dan ruang lingkup lainnya. Bulan Juni 2010 PT Saraswanti Indo Genetech membangun gedung baru yang lebih luas yaitu sekitar 4000 m² dengan 6 lantai, gedung baru mulai di tempati pada bulan September 2011 berlokasi di Graha SIG jalan Rasamala 20 Taman Yasmin Bogor.

2.2 Minuman Kopi Kemasan

Kopi adalah minuman yang dihasilkan dari pengolahan ekstraksi biji kopi. Tanaman kopi dapat tumbuh dimana saja pada iklim *tropis* maupun *subtropis* dan pada dataran rendah maupun dataran tinggi tergantung dengan jenis kopinya . Kopi pertama kali di konsumsi pada abad ke-9, kopi berasal dari Benua Afrika tepatnya di daerah Abyssinia, nama daerah lawas di Afrika yang mencakup negara Ethiopia dan Eritrea. Tahun 1696 kopi masuk ke Indonesia tepatnya di Pulau Jawa dibawa oleh *Vereenigde ootindische compagnie* (VOC) sebuah persekutuan dagang asal Belanda yang menjadikan Indonesia sebagai pusat produksi hasil perkebunan termasuk kopi, awalnya tanaman kopi di bawa ke Pulau Jawa hanya untuk tahap percobaan, namun ternyata dapat tumbuh dengan subur, mengetahui hasil yang menguntungkan dan memuaskan untuk komoditas perdagangan, VOC menyebarkan bibit kopi ke berbagai wilayah Indonesia untuk ditanam oleh para penduduk (Najiyati dan Danarti,2004).

Perkembangan kopi terus meningkat dari waktu ke waktu dan menjadi minuman terpopuler di dunia. Minuman kopi saat ini beraneka ragam jenisnya

tidak hanya kopi hitam saja namun saat ini kopi banyak variasi rasa dengan berbagai proses penyajian dan pengolahan yang unik dengan penambahan bahan pangan lain seperti *creamer*, susu, coklat, *wiski*, gula, dan bahan tambahan pangan lainnya agar didapat citarasa yang nikmat. Minuman kopi kemasan yang terjual dipasaran juga memiliki citarasa yang tidak kalah nikmat dengan kopi-kopi yang ada di cafe dengan berbagai macam variasi rasa, tidak harus menunggu lama untuk menyeduh, kopi kemasan menjadi pilihan paling efektif bagi para penikmat kopi. Minuman ini, tidak begitu menarik di negara barat karena alasan cita rasa. Akan tetapi minuman kopi kemasan sangat populer di Negara Jepang. Bang Jepanglah penemu minuman kopi kemasan pertama kali di Dunia, kopi kaleng ditemukan oleh Uishima Tadau sedangkan penemu kopi susu kaleng dinamakan *Mira Coffe*.

Tabel 2. 1 Syarat Mutu Minuman Kopi dalam Kemasan (SNI 01-4314-1996)

| NO. | JENIS UJI | SATUAN | PERSYARATAN |
|-----|--------------------------|---------|---|
| | Kedaaan : | | |
| 1. | Bau | - | Khas normal |
| 2. | Rasa | - | Khas normal |
| 3. | Warna | - | Khas normal |
| 4. | Kafein | mg/kg | Min. 200 |
| 5. | Bahan tambahan makanan | | |
| 6. | Pemanis buatan: | | |
| | - Sakarin | - | Tidak boleh ada |
| | - Siklamat | - | Tidak boleh ada |
| 7. | Pewarna tambahan | | Sesuai dengan SNI 01-0222-1995 |
| 8. | Cemaran logam : | | |
| | - Timbal (Pb) | mg/kg | Maks 0,2 |
| | - Tembaga (Cu) | mg/kg | Maks 2,0 |
| | - Seng (Zn) | mg/kg | Maks 5,0 |
| | - Timah (Sn) | mg/kg | Maks 40,0/259,0* (dikemas dalam kaleng) |
| | - Cemaran arsen (As) | mg/kg | Maks 0,1 |
| 9. | Cemaran Mikroba : | | |
| | - Angka lempeng total | Kol/MI | Maks 10 ² |
| | - Coliform | APM/mL. | < 3 |
| | - Clostridium perfringes | Per mL | 0 |
| | - Staphylococcus aureus | Per mL | 0 |

Minuman kopi kemasan merupakan minuman yang terbuat dari campuran ekstrak kopi dan air minum dengan atau tanpa penambahan bahan tambahan pangan dan bahan tambahan pangan yang telah diizinkan, dikemas secara hermetik (SNI 01-431314-1996, 1996). Syarat mutu untuk minuman kopi dalam kemasan dapat dilihat pada Tabel 2.1. Kopi siap minum di Indonesia dapat dinikmati dalam berbagai macam bentuk kemasan, yaitu antara lain botol kaca, kaleng, *tetra* (*tetrapack* dan *tetrawedge*), cup plastik dan botol plastik. Rasa dalam minuman kopi kemasan awalnya hanya RTD-*Coffee* lebih dominan ke rasa original (*black coffee*), namun saat ini tersedia varian rasa, seperti *cappucino*, *latte*, *mochaccino*, *milk coffee*, *caramel coffe*, *vanilla coffee*, dan sebagainya (Siregar, 2014)

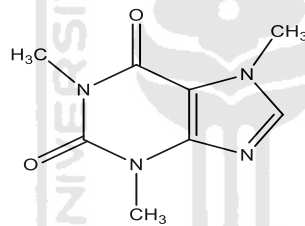
Minuman kopi saat ini memiliki olahan dan citrasa yang berbeda seiring dengan kreativitas peracik. Menurut Winarno dan Darsono (2019), jenis variasi rasa minuman kopi yang banyak dijumpai yaitu :

- a. Kopi hitam : merupakan kopi yang dihasilkan dari ekstraksi langsung perebusan biji kopi murni tanpa penambahan bahan tambahan pangan apapun.
- b. *Ekspresso* : merupakan minuman kopi yang dihasilkan dengan cara mengekstrak biji kopi menggunakan uap panas bertekanan tinggi.
- c. *Latte* : satu jenis dengan kopi *ekspreso* namun ada penambahan susu dengan perbandingan 3:1 antara susu dan kopi, jadi rasa yang dihasilkan lebih dominan susu.
- d. *Coffe machiatom* : merupakan kopi *ekspreso* namun ada penambahan susu dengan perbandingan antara kopi dan susu yaitu 4:1.
- e. *Cappuccino* : Merupakan minuman kopi yang ditambahkan susu, *cream*, dan coklat.
- f. *Dry cappuccino*: mirip dengan *cappuccino* namun tanpa penambahan susu.
- g. *Frappe* : *Espresso* dengan penyajian dingin.
- h. Kopi instan : Merupakan hasil dari proses pengeringan biji kopi dan *digranulasi*.

- i. Kopi tubruk : Merupakan kopi asli Indonesia yang pengolahannya dengan cara disangrai kemudian ditumbuk langsung bersama gula.
- j. *Mocca*: mirip dengan cappucino dan *latte*, namun ditambahkan dengan sirup coklat.

2.3 Kafein

Kafein merupakan senyawa terpenting dalam biji kopi yang banyak terkandung di dalamnya. Kafein dapat mempengaruhi aroma dan citarasa dalam kopi. Kafein ini lah yang mempengaruhi citarasa kopi menjadi pahit (Olivia, 2012). Selain dalam biji kopi, kafein juga secara alami ditemukan dalam daun teh, coklat, buah, dan lebih dari 60 spesies tanaman. Kafein juga dapat digunakan untuk bahan tambahan dalam minuman berenergi dan campuran obat. Kafein murni berupa serbuk berbentuk jarum halus berwarna putih yang mengkilat, tidak berbau, rasanya pahit, dan dapat meleleh pada suhu 236,5 °C (Belitz, dkk. 2009).



Gambar 2. 1 Struktur Kafein (C₈H₁₀N₄O₂)

Kafein mempunyai efek relaksasi yang dapat bermanfaat secara klinis, seperti menstimulasi susunan sel syaraf pusat, merelaksasi otot polos bronkus sehingga mengakibatkan penurunan mocus dan menstimulasi otot jantung (Ramayulis, 2014). Selain itu, jika mengkonsumsi kafein secara berlebihan dapat menimbulkan kecanduan dengan gejala sakit kepala, mengganggu keseimbangan kandungan lemak, mengganggu tekanan darah, mengganggu sekresi asam lambung dalam darah, sering buang air kecil, insomnia dan jantung berdebar (Olivia, 2012). Namun kandungan kafein dalam kopi mempunyai efek yang berbeda-beda pada masing-masing individu. Beberapa orang ada yang langsung mengalami efeknya sementara orang lain tidak merasakan efeknya sama sekali. Hal ini disebabkan oleh sifat genetika masing-masing individu tidak sama. Kafein didistribusikan ke seluruh cairan pada tubuh, termasuk pada otak dan kadar tinggi di otot. Kafein

tidak disimpan dalam tubuh, artinya setelah minum kopi atau minuman yang mengandung kafein, kafein tidak menumpuk pada tubuh. Kafein memiliki waktu paruh (waktu untuk keluar dari dalam tubuh) sekitar 3 sampai 10 jam. Rata-rata setelah 6 jam mengonsumsi kopi, separuh dari jumlah kafein yang masuk ke dalam tubuh akan dikeluarkan (Olivia, 2012).

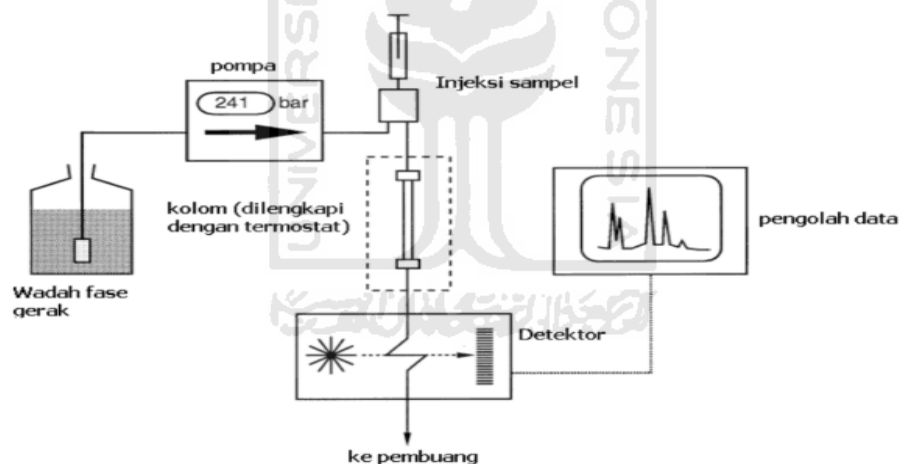
Kafein bekerja didalam tubuh dengan cara mengambil alih reseptor *adenosin* dalam sel saraf yang dapat memicu produksi hormon *adrenalin* dan mengakibatkan peningkatan tekanan darah, sekresi asam lambung, aktifitas otot, dan perangsangan hati untuk melepaskan senyawa gula pada aliran darah untuk menghasilkan energi ekstra (Ikrawan, 2007). Menurut IFIC (2007) mengonsumsi kopi dan minuman yang mengandung kafein secara teratur dapat menimbulkan beberapa efek ringan yang tidak diinginkan. Gejala jangka pendek akan dapat dirasakan jika menghentikan kebiasaan untuk mengonsumsi kafein, terutama jika menghentikannya secara tiba-tiba. Batasan wajar mengonsumsi kafein (*moderate intake*) yaitu sekitar 300 mg/hari (\pm tiga cangkir kopi perhari) tidak menyebabkan gangguan kesehatan pada orang dewasa, namun pada beberapa kelompok penderita hipertensi dan kelompok lansia akan lebih beresiko terkena penyakit tersebut.

2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Validasi metode uji kafein dalam minuman kopi ini menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah suatu metode analisa yang digunakan untuk pemisahan analit yang didasarkan pada elusi dari fase gerak terhadap fase diam. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dapat digunakan untuk uji kafein dalam minuman kopi yang didasarkan pada sifat kepolaran dari fase diam yang digunakan dan sifat kepolaran dari senyawa kafein. Sistem KCKT di laboratorium jasa banyak dipilih oleh *customer* karena metode ini tergolong lebih murah dalam pengujiannya dibandingkan instrumen lain, namun hasil yang diperoleh tetap akurat dan presisi, waktu analisis cepat, mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, mampu mengukur kadar sampel yang sangat rendah, daya pisah yang tinggi,

sensitif, kolom dapat digunakan kembali, dan dapat digunakan untuk menganalisis partikel yang berukuran sangat kecil (Harmita, 2004).

Prinsip KCKT yaitu, fase gerak didorong melalui kolom dengan tekanan yang dikehendaki dan laju tertentu hingga mencapai titik kesetimbangan. Sampel diinjeksikan ke dalam sistem kemudian akan dibawa oleh fase gerak melalui kolom. Sampel yang terbawa oleh fase gerak dalam kolom dipisahkan tergantung dari sifat kepolaran dari masing-masing analit dan akan keluar melalui detektor sebagai kromatogram pada waktu dan luas area tertentu (Rohman dan Gholib, 2007). Apabila molekul-molekul komponen berinteraksi secara lemah dengan fase diam maka komponen-komponen tersebut akan bergerak lebih cepat untuk meninggalkan fase diam. Keberhasilan dari pemisahan kromatografi yaitu bergantung pada daya interaksi komponen-komponen campuran dengan fase diam dan fase gerak.



Gambar 2. 2 Diagram Alat dan Komponen KCKT (Mayer, 2004)

Penjelasan dan fungsi komponen instrumen KCKT adalah sebagai berikut :

1. Wadah Fase Gerak

Wadah fase gerak digunakan sebagai alat penampung fase gerak sebelum dialirkan ke kolom. Syarat dari wadah fase gerak yaitu tidak mempengaruhi hasil uji atau bersifat *inert* dan harus tertutup rapat (Rohman dan Gholib, 2012). Wadah

fase gerak biasanya terbuat dari gelas dengan volume yang bervariasi sesuai dengan jumlah fase gerak yang akan dibutuhkan (Rohman dan Gholib, 2007).

2. Pompa

Pompa adalah alat yang digunakan memompa pelarut dari *reservoir* ke dalam kolom. Pompa akan terus bekerja memompa pelarut dengan membawa sampel dari injektor dilewatkan kolom menuju ke detektor dan akhirnya ke tempat pembuangan (Murningsih dan Chairul, 200). Syarat pompa yang baik digunakan yaitu tidak mempengaruhi pengujian atau bersifat *inert*. Pompa yang digunakan sebaiknya pompa yang mampu memberikan tekanan sampai 5000 Psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 3 mL/Menit (Rohman dan Gholib, 2012). Sistem pompa KCKT sudah diprogram untuk dapat melakukan elusi pada satu macam pelarut atau lebih. Sistem pompa pada KCKT dibagi menjadi dua yaitu isokratik dan gradien (Susanti dan Dachriyanus, 2017).

3. Injektor Sampel

Injektor merupakan bagian terpenting dalam penggunaan metode KCKT karena digunakan sebagai tempat masuknya sampel ke dalam sistem KCKT. Injektor berfungsi untuk memasukkan sampel ke dalam kolom yang dapat dilakukan dengan cara otomatis atau manual. Alat HPLC apabila dilengkapi dengan *automatic sampel injector*, maka memasukkan sampel dilakukan secara otomatis yaitu dengan memprogram pada *microprosesor control* dengan jumlah sampel μL dan dapat menganalisa bermacam-macam sampel yang berbeda, keuntungan menggunakan sistem ini yaitu volume analit yang diinjeksikan tidak berkurang selama proses analisis dan dapat memisahkan sampel-sampel dalam jumlah banyak dalam waktu yang singkat (Susanti dan Dachriyanus, 2017). Injektor secara manual dapat dilakukan dengan menggunakan jarum suntik khusus diantaranya 10-20 μL .

4. Kolom

Kolom merupakan bagian dari Sistem KCKT yang sangat penting. Kolom berfungsi untuk memisahkan cuplikan-cuplikan (sampel) yang ditahan secara selektif oleh fase diam, sampel akan terlarut oleh pelarut (fase gerak) yang terus mengalir dan membawanya melewati kolom (fase diam) menuju detektor.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) memiliki berbagai jenis kolom yang digunakan sesuai dengan keperluan dan senyawa kimia yang akan dipisahkan (Murningsih dan Chairul, 2000).

5. Oven

Oven berfungsi untuk meletakkan kolom agar tetap dalam keadaan stabil. Suhu tinggi pada kolom akan mengakibatkan pemisahan menjadi lebih efisien namun suhu yang lebih besar dari 60°C akan mengakibatkan terjadinya penguraian fase diam ataupun fase gerak sehingga analit tidak sesuai (Susanti dan Dachriyanus, 2006).

6. Detektor

Detektor adalah alat yang digunakan untuk mendeteksi komponen-komponen kimia yang telah terpisahkan setelah melewati kolom (Murningsih dan Chairul, 2000). Detektor KCKT yang baik yaitu memiliki sensitifitas cukup tinggi, gangguan (*noise*) yang rendah, respon linier yang luas, tidak merusak cuplikan dan memberikan respon untuk semua tipe senyawa (Hendrayana, 2006). Sehingga dapat memberikan perubahan sinyal yang besar pada perubahan konsentrasi komponen cuplikan yang kecil (Rohman dan Gholib, 2000). Detektor KCKT dikategorikan menjadi 2 golongan, yaitu detektor universal, merupakan detektor yang mampu mendeteksi zat umum, tidak spesifik dan tidak selektif (detektor indeks bias dan spektrofotometri massa) dan golongan detektor spesifik, yang mampu mendeteksi analit secara spesifik dan selektif (detektor UV-Vis, fluoresensi, elektrikimia) (Hadjar dan Rohman, 1985). Detektor UV-Vis merupakan detektor yang paling sering digunakan dalam analisis kafein menggunakan KCKT. Detektor UV-Vis sensitif terhadap senyawa-senyawa polar dan senyawa yang memiliki gugus kromofor. Detektor UV-Vis dibagi menjadi dua tipe yaitu panjang gelombang tetap (*Fixed Wavelength*) dan panjang gelombang yang berbeda (*Multy Wavelength*) yang lebih dikenal dengan sebutan *Photodiode Array* (Susanti dan Dachriyanus, 2017).

7. Recorder

Recorder adalah alat paling sederhana yang digunakan untuk mencatat setiap sinyal yang muncul kemudian akan dirubah dalam bentuk kurva atau disebut kromatogram (Murningsih dan Chairul, 2000).

2.5 Analisis Kafein menggunakan KCKT

Analisis kafein dapat dilakukan menggunakan injektor dengan cara otomatis atau manual tergantung instrumen KCKT yang digunakan. Pompa jenis isokratik dapat digunakan untuk uji kafein, dimana *eluen/solvent* menggunakan komposisi konstan yang dipompakan ke dalam kolom selama analisis berlangsung, artinya selama proses pemisahan, komposisi *solvent* tetap atau tidak berubah (Rubiyanto, 2016). Pompa berfungsi untuk mendorong fase gerak yang membawa sampel untuk melewati kolom. Fase gerak yang dapat digunakan yaitu bersifat polar, karena kafein merupakan senyawa yang bersifat polar, maka fase gerak yang digunakan harus sama-sama bersifat polar agar dapat mendorong senyawa kafein melewati kolom. Kolom jenis *reversed phase C 18* tepat untuk pengujian kafein karena kolom *reversed phase C 18* yaitu silika yang ditempeli oleh atom karbon sebanyak 18, karena banyaknya atom karbon maka kolom ini bersifat non polar sedangkan kafein bersifat polar, maka senyawa-senyawa non polar dari minuman kopi akan melekat lebih lama pada kolom yang sama-sama bersifat non polar, oleh karena itu senyawa kafein yang bersifat polar akan keluar lebih cepat melewati kolom. Oven berfungsi untuk meletakkan kolom agar tetap dalam keadaan stabil, suhu tinggi pada kolom akan mengakibatkan pemisahan menjadi lebih efisien. Pemilihan jenis detektor juga penting untuk dilakukan dalam analisis senyawa kafein menggunakan KCKT, Detektor UV-Vis merupakan detektor yang paling sering digunakan dalam analisis kafein menggunakan HPLC. Detektor UV-Vis sensitif terhadap senyawa-senyawa polar dan senyawa yang memiliki gugus kromofor. Detektor UV-Vis dibagi menjadi dua tipe yaitu panjang gelombang tetap (*Fixed Wavelength*) dan panjang gelombang yang berbeda (*Multy Wavelength*) yang lebih dikenal dengan sebutan *Photodiode Array* (Susanti dan Dachriyanus, 2017). Detektor *photodiode-array* (PDA) dapat memberikan

kumpulan kromatogram dalam waktu yang hampir bersamaan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses, maka detektor PDA mampu memberikan lebih banyak informasi komposisi suatu sampel. Detektor jenis ini tepat untuk pengujian kafein karena mampu menghasilkan spektrum UV pada setiap puncaknya, kafein menghasilkan gugus kromofor. Kromofor merupakan suatu molekul atau bagian dari suatu molekul yang mengabsorpsi sinar di daerah UV-Vis (Suharti, 2017).

2.6 Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

Uji kesesuaian sistem adalah serangkaian uji yang dilakukan untuk mengetahui kinerja dari alat KCKT terhadap metode yang digunakan dengan cara menginjeksikan 1 titik konsentrasi standar ke dalam sistem KCKT sebanyak 6 kali ulangan. Uji kesesuaian sistem penting dilakukan secara rutin karena bertujuan untuk memastikan apakah sistem operasional KCKT sudah beroperasi dengan baik efektif dan memberikan hasil analisis yang valid untuk pengujian. Komponen penentuan uji kesesuaian sistem meliputi presisi, faktor *tailing*, *resolusi* dan jumlah plat teoritis (Gandjar dan Rohman, 2007).

2.6.1. Presisi

Presisi adalah parameter uji yang digunakan untuk mengetahui kedekatan hasil dari keterulangan pengujian. Presisi dinyatakan sebagai *Presentase Relative Standar Deviation* (% RSD), semakin kecil nilai % RSD yang diperoleh maka semakin tinggi tingkat ketelitiannya. % RSD dapat diterima dan dikatakan memiliki presisi yang baik jika lebih rendah dari 2/3 % CV Horwitz (AOAC, 2012).

2.6.2. Faktor *tailing*

Faktor *tailing* adalah pengukuran asimetri puncak. Peningkatan dari puncak asimetri menyebabkan penurunan resolusi, batas deteksi, presisi dan mengalami pemisahan yang memburuk. Batas keberterimaan faktor *tailing* yaitu $T \leq 2$ (Mukhejee dan Bera, 2012). Bentuk kromatogram yang normal yaitu jika faktor *tailing* berada pada rentang yang diizinkan, $T \leq 2$. Faktor *tailing* dihitung dengan persamaan (1).

$$T = \frac{W_{5\%}}{2f} \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan :

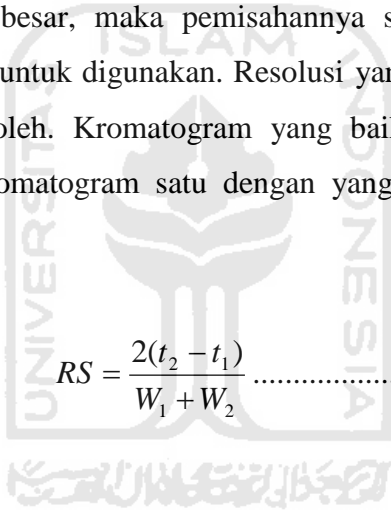
T = Faktor *tailing*

W₅ = Lebar puncak yang terukur 5% dari tinggi puncak

f = Jarak antara titik awal puncak dan titik maksimum puncak

2.6.3. Resolusi (daya pisah)

Resolusi adalah jarak antara waktu retensi dari dua puncak yang saling berdekatan. Nilai resolusi yang baik yaitu > 1,5 menunjukkan bahwa kedua kromatogram tersebut dapat terpisah dengan baik (Snyder dkk,2010). Resolusi yang diperoleh semakin besar, maka pemisahannya semakin sempurna yang menandakan sistem layak untuk digunakan. Resolusi yang baik dapat dilihat dari kromatogram yang diperoleh. Kromatogram yang baik yaitu jika peak tidak tumpang tindih antara kromatogram satu dengan yang lain. Resolusi dihitung dengan persamaan (2).



$$RS = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

R = Resolusi

t = Waktu retensi ke-n

W = Lebar puncak

2.6.4. Jumlah plat teoritis

Jumlah plat teoritis (N) adalah banyaknya distribusi keseimbangan yang terjadi pada suatu kolom. Plat teoritis (*Theoretical Plate*) digunakan untuk menunjukkan efisiensi kolom (Susanti dan Dachriyanus, 2017). Efisiensi kolom berhubungan dengan pelebaran puncak dari pita awal ketika melewati kolom. Efisiensi kolom dikatakan baik jika didapatkan nilai N > 2000. Semakin besar nilai N maka semakin baik pemisahannya (Rubiyanto, 2016). jumlah *plat teoritis* (N) dapat dihitung dengan persamaan (3).

$$N = 16 \left| \frac{t}{w} \right|^2 \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan :

t = Waktu retensi

w = Lebar dasar puncak

2.7 Validasi Metode

Validasi metode analisis adalah suatu metode pengujian yang dilakukan oleh analis berdasarkan percobaan di laboratorium terhadap parameter tertentu untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan sudah memenuhi persyaratan dan tujuan dalam penggunaannya (Harmita, 2004). Validasi metode dapat digunakan sebagai data kinerja dari laboratorium terhadap satu bahkan lebih metode uji. Metode uji perlu divalidasi jika, metode tersebut masih baru dan akan digunakan untuk pengujian rutin. Jadi, dalam penentuan validasi metode analisa yang diuji atau divalidasi yaitu PROTAP (prosedur tetap) pengujian yang akan dilakukan yang selanjutnya akan digunakan dalam pengujian rutin. PROTAP (prosedur tetap) disusun oleh bagian QC (*Quality Control*) atau bagian R&D (*Risert and Development*). Metode analisa tersebut, dapat disusun diambil dari berbagai literatur resmi, metode baku (misal AOAC, SNI, dan ASTM), dapat juga berasal dari pengembangan sendiri dan modifikasi pengujian yang telah ada. Metode yang harus di validasi oleh laboratorium yaitu :

1. Metode tidak baku
2. Metode yang didesain atau dikembangkan sendiri oleh laboratoium
3. Metode baku yang digunakan diluar lingkup yang dimaksud
4. Metode baku yang dimodifikasi
5. Metode baku untuk menegaskan dan mengkonfirmasi bahwa metode tersebut sesuai dengan penggunaan yang dimaksudkan (Riyanto, 2014).

Validasi metode sangat penting dilakukan karena merupakan elemen penting dalam control kualitas dan dapat membantu memberikan jaminan bahwa hasil pengukuran dapat diandalkan (Riyanto, 2014). Selain itu, validasi juga dapat menambah kepercayaan pada kastemer akan hasil pengujian yang telah dilakukan

karena validasi metode dapat menjadi bukti yang otentik. Menurut Riyanto (2014), berikut merupakan 4 alasan suatu metode harus di validasi, apabila :

1. Suatu metode baru yang akan dikembangkan karena suatu permasalahan tertentu.
2. Suatu metode rutin dalam laboratorium yang dilakukan perbaikan atau revisi.
3. Suatu metode rutin yang berubah terhadap waktu hasil dan *quality control chart*.
4. Suatu metode rutin yang dilakukan di laboratoium berbeda, analisis berbeda dan peralatan yang berbeda.

Pemilihan parameter validasi tergantung dari beberapa faktor seperti aplikasi, sampel uji, tujuan dari metode, dan peraturan lokal maupun internasional. Parameter metode analisis yang digunakan harus memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan, terutama untuk menjamin bahwa metode analisis tersebut memberikan hasil yang cermat dan handal sehingga dapat dipercaya. Menurut Riyanto (2014) parameter validasi terdiri dari parameter linieritas, *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantification* (LOQ), *robustness*, presisi, akurasi, dan estimasi ketidakpastian.

2.7.1 Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode uji untuk mendapatkan hasil pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit sampel pada kisaran yang ada. Rentang metode merupakan pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linieritas yang memenuhi batas keberterimaan. Rentang dapat dilakukan dengan cara membuat kurva kalibrasi dari larutan standar yang telah ditentukan konsentrasinya (Eremer dan Miller, 2005). Linieritas digunakan untuk mengetahui kemampuan standar dalam mendeteksi analit dalam suatu contoh. Linieritas juga dilakukan untuk mengetahui hubungan antara 2 variabel apakah memiliki hubungan yang linier atau tidak atau hasil yang berbanding lurus dengan analit (ICH, 2005). Linieritas merupakan parameter ukuran seberapa baik kurva kalibrasi antara respon (y) dan konsentrasi (x), pengukurannya dilakukan dengan cara pengukuran tunggal pada

konsentrasi yang berbeda kemudian ditentukan nilai *slope*, *intersep*, dan koefisien korelasinya (Gandjar dan Rohman, 2007). Uji linieritas dapat ditentukan dengan cara membuat kurva kalibrasi dari berbagai konsentrasi minimum sebanyak lima konsentrasi yang berbeda (Harmita, 2004). Respon yang diperoleh harus berbanding lurus dengan konsentrasi analit. Persamaan tersebut didapatkan dari metode kuadrat terkecil yaitu $y = ax \pm b$ dengan a adalah *slope* dan b adalah *intersep*, x adalah konsentrasi analit dan y adalah absorbansi. Persamaan tersebut akan menghasilkan koefisien korelasi (r) dan koefisien determinasi (R^2). Menurut Chan dkk (2004) Linieritas yang baik dan memenuhi persyaratan adalah jika koefisien determinasi $\geq 0,997$ dan koefisien korelasi $> 0,990$. Linieritas juga dapat diketahui dari kemiringan garis, *intersep* dan residual (Eremer and Miller, 2005).

2.7.2 Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantification (LOQ)

Limit of Detection (LOD) adalah konsentrasi terkecil analit dalam contoh yang dapat terdeteksi namun tidak perlu terkuantisasi dibawah kondisi pengujian yang telah disepakati (Kantasubrata, 2008). Artinya nilai yang dihasilkan tidak harus memenuhi kriteria dari presisi dan akurasi, namun nilai LOD untuk KCKT harus memenuhi syarat keberterimaan yaitu S/N sebesar 3 : 1 atau $S/N \geq 3$ (Priyambodo, 2014).

Limit of Quantification (LOQ) adalah konsentrasi terendah dari analit dalam contoh yang dapat ditentukan dengan tingkat presisi dan akurasi yang dapat diterima, dibawah kondisi pengujian yang telah disepakati (Kantasubrata, 2008). Data yang diperoleh dari presisi dilaporkan sebagai % RSD dan data yang diperoleh dari akurasi dilaporkan sebagai presentasi perolehan kembali (% *recovery*) (ICH, 2005). Nilai batas keberterimaan % *recovery* yaitu pada rentang 80%-115%, sedangkan untuk presisi batas keberterimaan yaitu apabila nilai RSD $\leq 2/3$ CV Horwitz (%). Nilai LOQ untuk KCKT harus memenuhi syarat keberterimaan yaitu S/N sebesar 10 : 1 atau $S/N \geq 10$ (Priyambodo, 2014).

2.7.3 Presisi

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan drajat kesesuaian antara hasil uji individual, yang diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari

campuran yang homogen (Harmita, 2004). Presisi dinyatakan sebagai *Presentase Relative Standar Deviation* (%RSD). Besarnya % RSD menunjukkan tingkat ketelitian dari analisis, semakin kecil nilai % RSD yang diperoleh maka semakin tinggi tingkat ketelitiannya. Terdapat tiga tipe evaluasi yang dapat dilakukan terhadap parameter presisi metode (Chan, dkk. 2004) yaitu :

a) *Repeatability* (keterulangan)

Keterulangan merupakan ketelitian yang didapatkan dari hasil pengulangan yang dilakukan dalam kondisi yang sama, dalam interval waktu singkat dengan penggunaan laboratorium yang sama, analisis yang sama, dan bahan serta alat yang sama. Keterulangan bertujuan untuk mengetahui konsistensi dari analitis, tingkat kesulitan metode dan kesesuaian metode.

b) *Reproducibility* (ketertiruan)

Ketertiruan merupakan ketelitian yang dihitung dari hasil penetapan ulangan dengan menggunakan metode yang sama, namun dilakukan oleh analisis yang berbeda serta peralatan, laboratorium, dan waktu yang berbeda.

c) *Intermediette precision* (presisi antara)

Presisi antara merupakan bagian dari presisi yang dilakukan dengan cara mengulang pemeriksaan terhadap contoh uji dengan waktu, alat, dan analisis yang berbeda namun dikerjakan di laboratorium yang sama. Pengujian dikatakan presisi jika diperoleh nilai % RSD < 2%, tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung dari jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Nilai % RSD atau koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analitis yang dianalisis (Harmita, 2004). Uji presisi dilakukan untuk mengetahui kedekatan atau kesesuaian antara hasil uji yang satu dengan yang lainnya pada serangkaian pengujian.

Presisi dari metode uji dapat diukur menggunakan standar deviasi (SD) untuk mendapatkan *Relative Standar Deviation* (%RSD). Standar deviasi (SD) dapat dihitung menggunakan persamaan (4) dan *Relative Standar Deviation* (%RSD) dapat dihitung dengan persamaan (5).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \dots\dots\dots(4)$$

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\% \dots\dots\dots(5)$$

Keterangan :

SD = Standar deviasi

% RSD = *Relative Standar Deviation*

\bar{X} = Nilai rata-rata konsentrasi

n = Jumlah ulangan

% RSD : *Relatif standar deviation*

Presisi dilakukan dengan membandingkan antara % RSD dengan CV horwitz. CV Horwitz merupakan suatu ketetapan untuk menentukan koefisien variasi dari data yang telah diperoleh, nilai CV Horwitz ditentukan dengan persamaan (6).

$$\% CV \text{ Horwitz} = 2^{1-0,5 \log C} \dots\dots\dots(6)$$

Nilai C adalah rata-rata konsentrasi dari larutan standar dikali 10^{-6} sebagai konversi dari ppm ke persen. % RSD dapat diterima dan dikatakan memiliki presisi yang baik jika lebih rendah dari 2/3% CV Horwitz (AOAC, 2012).

2.7.4 Akurasi

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan drajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dapat dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*% recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi ditentukan melalui dua cara, yaitu metode simulasi (*Spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*) (Riyanto, 2014). Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali dari suatu pengukuran dengan dilakukan spiking pada suatu sampel. Pendekatan umum yang digunakan saat melakukan uji akurasi yaitu (1) menggunakan SRM (*Standart Reference Material*), (2) melakukan spiking, (3) menggunakan metode penambahan standar (*standard addition method*) (Abdul, 2014). Parameter akurasi dapat diperoleh dengan pengumpulan data dari 9 penetapan kadar dengan konsentrasi yang berbeda seperti 3 konsentrasi dengan 3 kali replikasi. Data yang diperoleh dilaporkan sebagai presentasi perolehan kembali (*% recovery*)

(ICH,2005). Metode dikatakan baik apabila nilai perolehan kembali (*% recovery*) memenuhi nilai presentase *% recovery*. Presentase *% recovery* yang dapat diterima yaitu sesuai dengan konsentrasi analit seperti pada Tabel 2.2

Tabel 2. 2 Range Penerimaan *Recovery* Hasil Uji (Day and Underwood,1999)

| Konsentrasi analit pada sampel (%) | <i>Recovery</i> yang diterima (%) |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| 100 | 98-102 |
| >10 | 98-102 |
| >1 | 97-104 |
| >0,1 | 95-105 |
| 0,01 | 90-107 |
| 0,001 | 90-107 |
| 0,0001 (1 ppm) | 80-110 |
| 0,00001 (100 ppb) | 80-110 |
| 0,000001 (10 ppb) | 60-115 |
| 0,0000001 (1ppb) | 40-120 |

Akurasi merupakan kemampuan metode analisis untuk mendapatkan nilai benar setelah dilakukan secara berulang. Nilai dari replika analisis semakin mendekati sampel yang sebenarnya maka semakin akurat metode tersebut (Khan,1996). Perhitungan perolehan kembali dapat ditentukan dengan persamaan (7).

$$\% Recovery = \frac{(C \text{ sampel} + C \text{ spike}) - (C \text{ sampel})}{C \text{ target}} \times 100\% \dots\dots\dots(7)$$

2.7.5 Robustness (Ketegaran)

Robustness (ketegaran) adalah kesetabilan dari metode analisis yang tidak terpengaruh dari variasi yang diberikan (Riyanto, 2014). Metode yang baik yaitu metode yang dapat stabil meskipun dilakukan perlakuan yang berbeda, hal ini akan menentukan kekuatan dari metode yang digunakan. Ketegaran metode kromatografi, misalnya dapat dilakukan pada variasi pemipetan volume sampel, variasi konsentrasi injeksi, variasi suhu kolom, variasi waktu injeksi, dan variasi fase gerak yang digunakan. Variasi tersebut dilakukan untuk mengetahui apakah jika dilakukan perubahan kecil dari metode normal yang telah ditetapkan masih

diperoleh hasil yang presisi. Interpretasi data dari *robustness* dapat dilakukan dengan uji statistik yaitu uji t-test atau uji anova (Riyanto, 2014).

2.7.6 Estimasi ketidakpastian

Menurut Hadi (2007) ketidakpastian merupakan parameter yang berhubungan dengan hasil uji pengujian atau kalibrasi, yang memberikan gambaran penyebaran nilai-nilai pengujian. Estimasi ketidakpastian pengukuran yaitu indikator yang digunakan untuk menentukan kehandalan dari suatu laboratorium pengujian. Estimasi ketidakpastian sebaiknya diterapkan dalam semua jenis pengujian dan/atau kalibrasi untuk menunjukkan data ketelitian hasil pengujian atau kalibrasi. Sumber-sumber penyebab dari ketidakpastian mencakup, tapi tidak terbatas pada standar acuan dan bahan acuan yang termasuk bahan kimia yang digunakan, metode dan peralatan yang digunakan, kondisi akomodasi dan lingkungan dari pengujian dan/atau kalibrasi, sifat dan kondisi sampel yang diuji dan/atau dikalibrasi, analis/personil. Ketidakpastian juga dapat didefinisikan sebagai parameter pengukuran untuk menentukan penyimpangan yang terjadi dari suatu pengukuran sehingga dapat diketahui hasil nilai benar dari pengujian. Pengukuran nilai menyimpang disebut sebagai pengukuran estimasi ketidakpastian yang menggabungkan semua kesalahan yang mungkin terjadi saat proses analisis menjadi satu rentang tunggal.

Perhitungan pengukuran dalam estimasi ketidakpastian bertujuan untuk membuktikan bahwa data hasil pengukuran terbukti akurat dan valid. Menurut Rohman (2014) ada 5 tahapan perhitungan estimasi ketidakpastian, antara lain:

1. Spesifikasi pengukuran

Spesifikasi pengukuran dengan jelas dinyatakan berkaitan dengan pengukuran, jika tahap pengambilan sampel mempengaruhi hasil, maka tahap pengambilan dimasukkan dalam sumber estimasi ketidakpastian berupa angka-angka.

2. Identifikasi sumber-sumber ketidakpastian

Sumber-sumber ketidakpastian seluruhnya harus terperinci untuk semua perlakuan yang berpotensi mempengaruhi hasil dari pengukuran. Sumber yang harus diperhatikan yaitu meliputi pengambilan sampel, kondisi pengambilan, pengaruh sampel, pengaruh komputasi atau input data, pengaruh analisis dan

pengaruh acak. Semua itu dapat digambarkan dengan diagram tulang atau *fish bond*.

3. Perhitungan ketidakpastian baku

Jika sumber telah diketahui dan diidentifikasi, maka selanjutnya yaitu mengkuantifikasi ketidakpastian yang berasal dari sumber-sumber penyumbang ketidakpastian. Sumber penyumbang dari ketidakpastian yang teridentifikasi keseluruhan harus dikuantifikasi dan diubah ke nilai ketidakpastian baku.



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat KCKT, labu ukur 100 mL, erlenmeyer 100 mL, mikropipet, pipet ukur 1mL, pipet ukur 5mL, pro-pipet, *water bath*, vial 20 μ L, tube, sentrifuge, pompa vakum, gelas piala 250 mL, gelas piala 500 mL, botol schott 1000mL, sonikasi, minisart 0,45 μ m.

3.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu akuabides, metanol, Pb asetat 23%, standar kafein, sampel minuman kopi.

3.3. Prosedur Kerja

3.3.1. Pembuatan larutan

3.3.1.1. Pembuatan larutan Pb asetat 23%

Pereaksi Pb asetat ditimbang sebanyak 115 g dan dimasukkan dalam gelas piala 500 mL, padatan tersebut diencerkan dengan akuabides hingga volume 200 mL, larutan disonikasi hingga larut, larutan dipindahkan dalam labu ukur 500 mL, larutan dalam labu ukur ditera menggunakan akuabides dan dihomogenkan.

3.3.1.2. Pembuatan fase gerak

Fase gerak dibuat dari metanol dan akuabides (35:65), masing-masing dimasukkan dalam botol schott 1000 mL, larutan disaring menggunakan pompa vakum, kemudian disonikasi hingga gelembung dan gas habis. Perbandingan tersebut dilakukan dengan sistem isokratik.

3.3.1.3 Preparasi standar induk 1012,91 mg/L

Standar kafein ditimbang sebanyak 25,45 mg dan dimasukkan dalam labu ukur 25 mL kemudian ditambahkan akuabides hingga tanda batas. Larutan digojok agar tercampur homogen.

3.3.1.4. Preparasi standar antara 101,29 mg/L

Standar induk kafein 1012,91 mg/L dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan akuabides hingga tanda batas. Larutan dihomogenkan.

3.3.2. Optimasi alat KCKT

Detektor : *Photodiode array* (PDA)
Kolom : *Reversed phase C 18*
Fase gerak : Metanol dan akuabides (35:65)
Laju alir : 0,75 mL/menit
Sistem pompa : Isokratik
Volume injeksi : 10 μ L
Suhu kolom : 35°C
Panjang gelombang : 272 nm

3.3.3. Pembuatan deret standar

Deret standar kafein dibuat 7 titik kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dengan perbandingan yang terdapat pada Tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Deret Standar Kafein

| Konsentrasi Standar (mg/L) | Konsentrasi Standar Induk (mg/L) | Volume Pipet (mL) | Volume Akhir (mL) |
|-------------------------------|--|----------------------|----------------------|
| 2,03 | 101,09 | 0,200 | 10 |
| 5,57 | 101,09 | 0,550 | 10 |
| 9,12 | 101,09 | 0,900 | 10 |
| 12,66 | 1012,91 | 0,124 | 10 |
| 16,21 | 1012,91 | 0,160 | 10 |
| 19,75 | 1012,91 | 0,194 | 10 |
| 23,30 | 1012,91 | 0,230 | 10 |

Larutan hasil pemipetan kemudian ditambahkan akuabides hingga tanda batas. Larutan disaring menggunakan filter GHP/PTFE/RC 0,2 μ m dan dimasukkan ke dalam vial 2 mL. Larutan diinjeksikan ke dalam sistem KCKT.

3.3.4. Preparasi sampel

Larutan sampel dipipet sebanyak 3 mL, dimasukkan dalam erlenmeyer 100 mL. Larutan ditambahkan 50 mL akuabides, 1 mL Pb asetat 23%, dan digojok agar tercampur homogen. Larutan dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 15 menit kemudian diangkat dan didinginkan pada suhu ruang. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas kemudian digojok larutan hingga homogen. Larutan dimasukkan pada tube 2 mL. Larutan disentrifuge 3 menit dengan kecepatan 1400 rpm kemudian disaring menggunakan minisart 0,45 μ m dan dimasukkan dalam vial 2 mL.

3.3.5 Uji kesesuaian sistem (UKS)

Preparasi larutan standar tengah yaitu konsentrasi 9,12 mg/L kemudian diinjeksikan ke dalam sistem KCKT sebanyak 6 kali.

3.3.6. Uji spesifitas.

3.3.6.1. Larutan standar dalam blanko pelarut

Konsentrasi standar 9,12 mg/L disaring menggunakan *syringe filter* GHP/RC dan dimasukkan ke dalam vial 2 mL. Larutan diinjeksikan dalam sistem KCKT. Larutan dipreparasi sebanyak 3 kali.

3.3.6.2. Larutan sampel yang mengandung analit

Larutan sampel dipipet sebanyak 3 mL, dimasukkan dalam erlenmeyer 100 mL. Larutan ditambahkan 50 mL akuabides, 1 mL Pb asetat 23% dan digojok agar tercampur homogen. Larutan dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 15 menit kemudian diangkat dan didinginkan pada suhu ruang. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas kemudian larutan disaring menggunakan minisart 0,45 μ m dan dimasukkan pada tube 2 mL. Larutan disentrifuge 3 menit dengan kecepatan 1400 rpm

kemudian disaring menggunakan minisart 0,45 μ m dan dimasukkan dalam vial 2 mL. Larutan dipreparasi sebanyak 3 kali.

3.3.6.3. Larutan sampel yang mengandung analit dan analit *interferens*.

Larutan sampel dipipet 3 mL ditambahkan *interferens* sebanyak 3 mL, masing-masing dibuat triplo, larutan dimasukkan dalam erlenmeyer 100 mL dan ditambahkan 50 mL akuabides, 1 ml Pb asetat 23%, kemudian digojok agar tercampur homogen. Larutan dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 15 menit kemudian diangkat dan didinginkan pada suhu ruang. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas kemudian larutan disaring menggunakan minisart 0,45 μ m dan dimasukkan pada tube 2 mL. Larutan disentrifuge 3 menit dengan kecepatan 1400 rpm kemudian disaring menggunakan minisart 0,45 μ m dan dimasukkan dalam vial 2 mL. Larutan dipreparasi sebanyak 3 kali.

3.3.7. Uji *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantification* (LOQ)

3.3.7.1. Uji *limit detection instrumen* (LDI)

Larutan standar dalam blanko pelarut dengan tiga konsentrasi terkecil yang masih memberikan respon positif pada alat diinjeksikan ke dalam sistem KCKT. Konsentrasi terkecil diamati yang menghasilkan nilai $S/N < 3$ dan $S/N \geq 3$. Konsentrasi dengan nilai $S/N \geq 3$ dibuktikan responnya dengan preparasi sebanyak 10 kali ulangan.

3.3.7.2. Uji *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantification* (LOQ) teoritis

Larutan blanko sampel *dispike* dengan konsentrasi \geq LDI. Larutan diinjeksikan dalam sistem KCKT sebanyak 10 kali ulangan.

3.3.7.3. Uji *limit of detection* (LOD) praktik

banko sampel yang *dispike* analit dengan konsentrasi sesuai nilai LOD_T dipreparasi sebanyak 10 kali, larutan masing-masing diinjeksikan dalam sistem KCKT. Kadar blanko sampel yang *dispike* analit tersebut dihitung terhadap rerata pembacaan standar. Pengulangan diamati hingga keseluruhan didapatkan nilai $S/N \geq 3$, jika nilai $S/N < 3$ maka diulangi pengulangan dengan cara menaikkan konsentrasi *spike*.

3.3.7.4. Limit of quantification (LOQ) praktik

Blanko sampel yang *dispike* analit dipreparasi dengan konsentrasi sesuai nilai LOQ_T, larutan masing-masing diinjeksikan dalam sistem KCKT sebanyak 10 kali. Kadar blanko sampel yang *dispike* analit tersebut dihitung terhadap rerata pembacaan standar.

3.3.8. Uji linieritas dan residual kurva

3.3.8.1. Batas linieritas

Kurva linieritas pada konsentrasi 0,20 - 1006,94 mg/L diinjeksikan dalam sistem KCKT, untuk menentukan batas atas dan batas bawah hingga di peroleh kurva yang secara visual melengkung (tidak linier).

3.3.8.2. Area kerja

Larutan deret standar area kerja pada konsentrasi 2,03; 5,57; 9,12; 12,66; 16,21; 19,75; 23,30 dipreparasi sebanyak 3 kali. Larutan deret standar diinjeksikan dalam sistem KCKT.

3.3.9. Uji akurasi

Larutan sampel tanpa *spiking* dipreparasi sebanyak 7 kali ulangan, larutan sampel yang di *spiking* dengan konsentrasi 80%, 100%, 120% dipreparasi sebanyak 7 kali ulangan. Masing-masing larutan diinjeksikan dalam sistem KCKT.

3.3.9.1. Pembuatan larutan sampel tanpa *spiking*

Larutan sampel dipipet sebanyak 3 mL, dimasukkan dalam erlenmeyer 100 mL. Larutan ditambahkan 50 mL akuabides, 1 mL Pb asetat, dan digojok agar tercampur homogen. Larutan dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 15 menit kemudian diangkat dan didinginkan pada suhu ruang. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas kemudian larutan disaring menggunakan minisart 0,45 µm dan dimasukkan pada tube 2 mL. Larutan disentrifuge 3 menit dengan kecepatan 1400 rpm kemudian disaring menggunakan minisart 0,45 µm dan dimasukkan dalam vial 2 mL.

3.3.9.2. Pembuatan akurasi dari 80% konsentrasi standar

Larutan sampel dipipet sebanyak 3 mL ke dalam erlenmeyer 100 mL kemudian ditambahkan dengan larutan standar induk kafein konsentrasi 1010,92 mg/L sebanyak 0,67 mL. Campuran tersebut ditambahkan akuabides sebanyak 50 mL, 1 mL Pb asetat, dan digojok agar tercampur homogen. Larutan dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 15 menit kemudian diangkat dan didinginkan pada suhu ruang. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas, larutan disaring menggunakan minisart 0,45 µm dan dimasukkan pada tube 2 mL. Larutan disentrifuge 3 menit dengan kecepatan 1400 rpm kemudian disaring menggunakan minisart 0,45µm dan dimasukkan dalam vial 2 mL.

3.3.9.3. Pembuatan akurasi dari 100% konsentrasi standar

Larutan sampel dipipet sebanyak 3 mL ke dalam erlenmeyer 100 mL kemudian ditambahkan dengan larutan standar induk kafein konsentrasi 1010,92 mg/L sebanyak 0,83 mL. Campuran tersebut ditambahkan akuabides sebanyak 50 mL, 1 mL Pb asetat, dan digojok agar tercampur homogen. Larutan dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 15 menit kemudian diangkat dan didinginkan pada suhu ruang. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas, larutan disaring menggunakan minisart 0,45 µm dan dimasukkan pada tube 2 mL. Larutan disentrifuge 3 menit dengan kecepatan 1400 rpm kemudian disaring menggunakan minisart 0,45µm dan dimasukkan dalam vial 2 mL.

3.3.9.4. Pembuatan akurasi dari 120% konsentrasi standar

Larutan sampel dipipet sebanyak 3 mL ke dalam erlenmeyer 100 mL kemudian ditambahkan dengan larutan standar induk kafein konsentrasi 1010,92 mg/L sebanyak 1 mL. Campuran tersebut ditambahkan akuabides sebanyak 50 mL, 1 mL Pb asetat, dan digojok agar tercampur homogen. Larutan dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 15 menit kemudian diangkat dan didinginkan pada suhu ruang. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas, larutan disaring menggunakan minisart 0,45 µm dan dimasukkan pada tube 2 mL. Larutan disentrifuge 3 menit dengan

kecepatan 1400 rpm kemudian disaring menggunakan minisart 0,45 μ m dan dimasukkan dalam vial 2 mL.

3.3.10. Uji *robustness* volume sampel

Larutan sampel dipreparasi dengan variasi *robust* volume pipipetan sampel yaitu 1 mL, 3 mL, 5 mL. Preparasi masing-masing variasi sebanyak 3 kali. Larutan diinjeksikan dalam sistem KCKT. Variasi pemipetan volume sampel berfungsi untuk mengetahui apakah hasil akan berbeda nyata atau tidak berbeda nyata.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

Uji kesesuaian sistem (UKS) penting untuk dilakukan dalam proses validasi metode sebelum pengujian sampel uji. Tujuannya untuk memastikan sistem kromatografi atau instrumen sudah berjalan dengan baik, efektif dan memberikan hasil analisis yang valid untuk pengujian. Uji Kesesuaian Sistem dilakukan dengan cara menginjeksikan larutan baku kerja sebanyak 6 kali ke dalam sistem HPLC. Komponen penentuan Uji Kesesuaian Sistem meliputi presisi, faktor *tailing*, *resolusi* dan jumlah *plat teoritis* (Gandjar dan Rohman, 2007). Hasil uji kesesuaian sistem yang telah dilakukan dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4. 1 Hasil Uji Kesesuaian Sistem

| Sampel | RT (menit) | Respon (Luas Area) | <i>Tailing</i> <i>Factor</i> | <i>Teoritical</i> <i>Plate</i> | Resolusi | |
|-----------|---------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | | | <i>Peak</i> sebelum | <i>Peak</i> sesudah |
| 1 | 8,10 | 341129,79 | 1,56 | 5451,17 | - | - |
| 2 | 8,09 | 345785,58 | 1,59 | 5402,20 | - | - |
| 3 | 8,09 | 346637,23 | 1,54 | 5451,86 | - | - |
| 4 | 8,09 | 339212,26 | 1,56 | 5520,24 | - | - |
| 5 | 8,09 | 344471,53 | 1,57 | 5412,47 | - | - |
| 6 | 8,09 | 347401,46 | 1,65 | 5333,24 | - | - |
| Rata-rata | 8,09 | 344106,31 | 1,58 | 5428,53 | - | - |
| SD | 0,0041 | 3256,63 | | | | |
| % RSD | 0,5 | 0,95 | | | | |

4.1.1. Presisi

Presisi merupakan ukuran kedekatan hasil analisis dari serangkaian pengukuran yang dilakukan secara berulang dari ukuran yang sama. Penentuan presisi pada uji kesesuaian sistem dilakukan terhadap *retention time* (RT) dan luas area yang diperoleh dari standar kafein. Hasil penentuan presisi dapat diukur menggunakan standar deviasi (SD) untuk mendapatkan *Relative Standar Deviation* (%RSD).

Berdasarkan Tabel 4.1 menunjukkan, nilai % RSD dari *retention time* (RT) sebesar 0,5 % dan nilai % RSD dari luas area sebesar 0,95 %, sehingga menunjukkan nilai presisi tersebut memenuhi syarat keberterimaan presisi yaitu % RSD < 2% (Harmita, 2004). Hasil yang diperoleh menunjukkan pengulangan yang dilakukan sebanyak 6 kali mendapatkan hasil yang dekat antara satu sama lain, artinya alat sudah bekerja secara optimum.

4.1.2. Resolusi

Resolusi (Rs) merupakan kemampuan untuk memisahkan antara dua kromatogram yang saling berdekatan. Nilai resolusi > 1,5 menunjukkan bahwa kedua kromatogram dapat terpisah dengan baik (Snyder dkk,2010).

Berdasarkan Tabel 4.1 nilai standar kafein setelah dilakukan 6 kali pengulangan menunjukkan tidak didapatkan hasil resolusi. Tidak didapatkan hasil resolusi artinya tidak ada pemisahan puncak yang terjadi, hal ini dikarenakan hanya standar kafein yang diukur pada parameter uji kesesuaian sistem, maka tidak ada jarak antar kromatogram.

4.1.3. Faktor *Tailing* (T)

Faktor *tailing* adalah pengukuran asimetri puncak. Peningkatan dari puncak asimetri menyebabkan penurunan resolusi, batas deteksi, presisi dan mengalami pemisahan yang memburuk. Batas keberterimaan faktor *tailing* yaitu $T \leq 2$ (Mukhejee dan Bera, 2012). Bentuk kromatogram yang normal yaitu jika faktor *tailing* berada pada rentang yang diizinkan, $T \leq 2$.

Berdasarkan Tabel 4.1 menunjukkan, nilai rata-rata faktor *tailing* sebesar 1,58 artinya hasil tersebut masuk dalam batas keberterimaan karena hasil yang yang diperoleh $T \leq 2$, menunjukkan alat sudah bekerja secara optimum.

4.1.4. *Theoretical Plate* (N)

Plat teoritis (*Theoretical Plate*) adalah ukuran yang menunjukkan efisiensi kolom kromatografi. Efisiensi kolom berhubungan dengan pelebaran puncak dari pita awal ketika melewati kolom. Kesenjangan pemisahan antara sampel dengan fase gerak dan fase diam dapat terjadi pada plat teoritis. Efisiensi kolom dikatakan baik jika didapatkan nilai $N > 2000$. Semakin besar nilai N maka

semakin baik pemisahannya karena puncak yang dihasilkan akan semakin tajam (Rubiyanto, 2016).

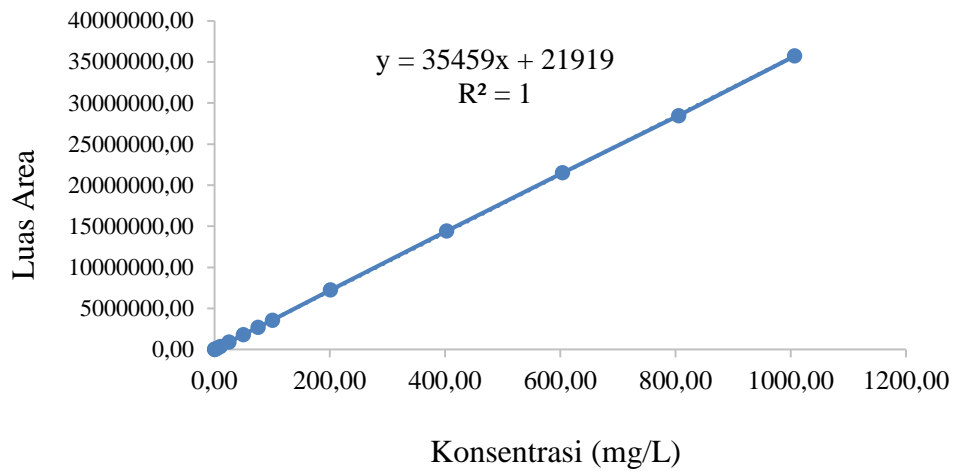
Berdasarkan Tabel 4.1 diperoleh nilai rata-rata *Theoretical Plate* sebesar 5428,53. Nilai yang diperoleh masuk dalam batas keberterimaan. Hasil tersebut akan mempertajam bentuk puncak yang dihasilkan. Puncak yang berbentuk tajam menunjukkan selektifitas dari alat baik, sehingga alat sudah bekerja secara optimum.

4.2. Validasi Metode

Validasi metode uji kafein dalam minuman kopi menggunakan KCKT di PT Saraswanti Indo Genetech Bogor ini bertujuan untuk mengetahui bahwa hasil analisis yang didapatkan sesuai dengan tujuan penggunaannya dan dapat dipertanggung jawabkan. Parameter-parameter yang diuji yaitu antara lain spesifitas, *Limit of Detection* (LOD), *Limit of Quantification* (LOQ), linieritas, presisi, *robustness* (Ketegaran), akurasi (Kecermatan), dan estimasi ketidakpastian.

4.2.1. Penentuan Linieritas

Batas linieritas adalah pernyataan batas bawah dan batas atas konsentrasi standar pada rentang kerja metode pengujian hingga diperoleh kurva yang secara visual melengkung (tidak linier). Batas linieritas digunakan untuk mengetahui sampai manakah area linier pada konsentrasi standar hingga menunjukkan hasil kurva yang tidak linier lagi. Penentuan batas linieritas dilakukan dengan mengukur konsentrasi terkecil se-LOQ sampai konsentrasi tertinggi sebesar konsentrasi standar induk yaitu 0,20-1006,94 mg/L. Hasil yang diperoleh dari kurva kalibrasi dapat ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4. 1 Kurva Kalibrasi Batas Linieritas

Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan area linier konsentrasi standar yaitu pada konsentrasi 0,20-1006,94 mg/L. Konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi pada rentang kerja pengujian yang telah di ukur menunjukkan hasil kurva yang tetap linier (tidak melengkung) dengan persamaan garis $y = 35459x + 21919$ dan koefisien korelasi (r) sebesar 1. Nilai koefisien korelasi yang diperoleh memenuhi syarat keberterimaan karena nilai yang diperoleh lebih besar dari syarat yang ditetapkan yaitu 0,990 (Chan dkk. 2004).

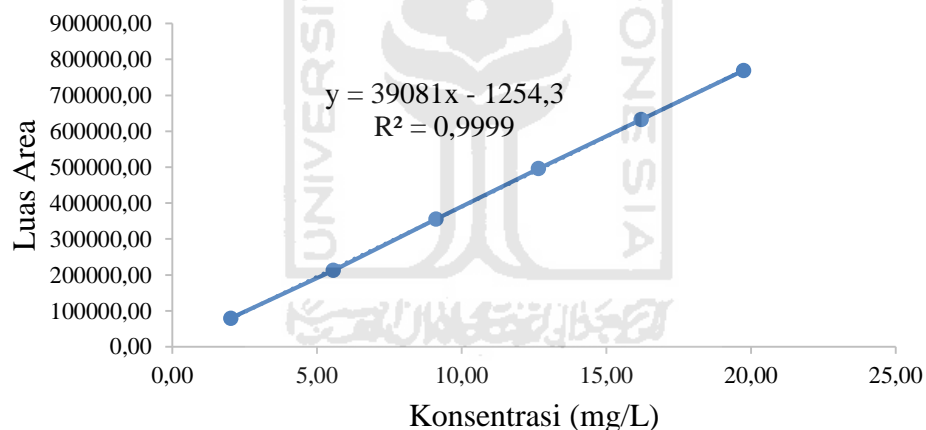
Linieritas merupakan kemampuan suatu metode analisis untuk menghasilkan respon yang proposional terhadap konsentrasi analit dalam sampel pada kisaran yang diberikan. Linieritas dalam suatu metode merupakan seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara konsentrasi (x) dan respon luas area (y) (Gandjar dan Rohman, 2007). Penentuan linieritas dilakukan dengan pengukuran larutan standar pada masing-masing parameter dengan jumlah ≥ 6 titik. Pengukuran luas area larutan standar dibuat dalam persamaan kurva kalibrasi, koefisien korelasi (r) dan koefisien determinasi (R^2). Koefisien korelasi menunjukkan hubungan antara konsentrasi dengan luas area, sedangkan nilai koefisien determinasi (R^2) menunjukkan kedekatan dari garis regresi linier dengan titik data sebenarnya.

Deret standar kafein yang digunakan pada konsentrasi standar area kerja presisi yaitu konsentrasi 2,03; 5,57; 9,12; 12,66; 16,21; 19,75; dan 23,30 mg/L.

Preparasi deret standar sebanyak 3 kali, kemudian diinjeksikan kedalam sistem kromatografi.

Tabel 4. 2 Luas Area Standar Kafein

| Konsentrasi standar (mg/L) (x) | Respon (Luas Area) (y) |
|-----------------------------------|---------------------------|
| 2,03 | 79375,40 |
| 5,57 | 212757,82 |
| 9,12 | 355554,36 |
| 12,66 | 496281,58 |
| 16,21 | 632607,77 |
| 19,75 | 769166,41 |
| 23,30 | 913388,18 |



Gambar 4. 2 Kurva Kalibrasi Linieritas

Data hasil penelitian yang diperoleh dari pengukuran dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan kurva kalibrasi linieritas standar kafein dapat dilihat pada gambar 4.2. Data luas area didapatkan persamaan garis $y = 39081x - 1254,3$. Hubungan antara luas area hasil pembacaan dan konsentrasi larutan standar kafein dilihat dari nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9999 dan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9999. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat korelasi antara nilai konsentrasi dan luas area. Semakin tinggi konsentrasi analit maka akan didapatkan luas area yang semakin besar. Nilai koefisien korelasi yang diperoleh

memenuhi syarat keberterimaan karena nilai yang diperoleh lebih besar dari syarat yang ditetapkan yaitu 0,990 (Chan dkk. 2004). Artinya koefisien korelasi menunjukkan hubungan yang linier antara sinyal detektor dengan jumlah analit kafein dalam sampel.

4.2.2. *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantification (LOQ)*

Limit of Detection (LOD) adalah konsentrasi terkecil analit dalam contoh yang dapat terdeteksi namun tidak perlu terkuantisasi dibawah kondisi pengujian yang telah disepakati (Kantasubrata, 2008). Artinya nilai yang dihasilkan tidak harus memenuhi kriteria dari presisi dan akurasi, namun nilai LOD untuk KCKT harus memenuhi syatir keberterimaan yaitu S/N sebesar 3 : 1 atau $S/N \geq 3$ (Priyambodo, 2014). *Limit of Detection (LOD)* merupakan 3 kali dari nilai standar deviasi.

Limit of Quantification (LOQ) adalah konsentrasi terendah dari analit dalam contoh yang dapat ditentukan dengan tingkat presisi dan akurasi yang dapat diterima, dibawah kondisi pengujian yang telah disepakati (Kantasubrata, 2008). Data yang diperoleh dari presisi dilaporkan sebagai % RSD dan data yang diperoleh dari akurasi dilaporkan sebagai presentasi perolehan kembali (% *recovery*) (ICH, 2005). Nilai batas keberterimaan % *recovery* yaitu pada rentang 80%-115%, sedangkan untuk presisi batas keberterimaan yaitu apabila nilai % $RSD \leq 2/3$ CV Horwitz (%). Nilai LOQ untuk KCKT harus memenuhi syarat keberterimaan yaitu S/N sebesar 10 : 1 atau $S/N \geq 10$ (Priyambodo, 2014). *Limit of Quantificatin (LOQ)* merupakan 10 kali dari nilai standar deviasi.

Limit of Detection (LOD) dan *Limit of Quantification (LOQ)* teoritis dilakukan dengan mengukur blangko yang dispike analit dengan konsentrasi \geq LDI sebanyak 10 kali ulangan, parameter LDI digunakan sebagai acuan kelayakan konsentrasi yaitu memiliki nilai $S/N \geq 3$. Data LDI dapat dilihat pada Tabel 4.4. *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantification (LOQ)* teoritis digunakan untuk memperkirakan *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantification (LOQ)* praktik. Data yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 4.3

Tabel 4. 3 *Limit Detection Instrumen (LDI)*

| Konsentrasi Standar Ukur (mg/L) | Respon (Luas area) | S/N |
|------------------------------------|--------------------|-------------|
| 0,0091 | 410,15 | 2,26 |
| 0,0101 | 427,69 | 3,44 |
| 0,0151 | 621,20 | 5,08 |

Tabel 4. 4 LDI Pengulangan 10 kali

| Sampel | Konsentrasi injeksi (mg/L) | S/N |
|---------------|-------------------------------|------|
| LDI Kafein 1 | 0,0101 | 3,06 |
| LDI Kafein 2 | 0,0101 | 3,49 |
| LDI Kafein 3 | 0,0101 | 3,03 |
| LDI Kafein 4 | 0,0101 | 3,38 |
| LDI Kafein 5 | 0,0101 | 4,20 |
| LDI Kafein 6 | 0,0101 | 3,52 |
| LDI Kafein 7 | 0,0101 | 3,57 |
| LDI Kafein 8 | 0,0101 | 3,43 |
| LDI Kafein 9 | 0,0101 | 4,91 |
| LDI Kafein 10 | 0,0101 | 3,38 |

Penentuan *Limit Detection Instrumen (LDI)* dilakukan dengan cara menginjeksikan konsentrasi standar dengan nilai sekecil mungkin yang masih memberikan respon positif pada alat dan menghasilkan nilai $S/N \geq 3$. Konsentrasi terkecil yang digunakan pada percobaan ini dapat dilihat pada Tabel 4.3. Nilai konsentrasi yang menghasilkan nilai $S/N \geq 3$ yaitu pada konsentrasi 0,0101 mg/L, selanjutnya konsentrasi dengan nilai $S/N \geq 3$ dibuktikan responnya dengan preparasi 10 kali. Jika terdapat larutan dengan $S/N < 3$ maka konsentrasi harus dinaikkan hingga didapatkan 10 data dengan nilai $S/N \geq 3$.

Tabel 4. 5 *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantification (LOQ)* Teoritis

| Parameter | Hasil | | Kriteria Keberterimaan |
|------------------|------------------------------------|------------|------------------------|
| | Konsentrasi injeksi | Kadar | |
| Rata-rata | 0,013 mg/L | 0,441 mg/L | - |
| Standar Deviasi | 0,0035 | 0,1175 | - |
| % RSD | 26,66 % | 26,66 % | $\leq 2/3$ CV Horwitz |
| 2/3 % CV Horwitz | 20,46 % | 18,10 % | |
| LOD | 0,0106 | 0,35 | $S/N \geq 3$ |
| LOQ | 0,0352 | 1,17 | $S/N \geq 3$ |
| Kesimpulan | Belum memenuhi batas keberterimaan | | |

Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan diperoleh nilai % RSD sebesar 26,66 % dengan 2/3 % CV Horwitz sebesar 18,10 untuk *Limit of Detection (LOD)* teoritis sebesar 0,35 mg/L dan *Limit of Quantification (LOQ)* teoritis sebesar 1,17 mg/L. Parameter yang ditentukan belum memenuhi batas keberterimaan karena diperoleh nilai % RSD > 2/3 % CV Horwitz, maka harus dilakukan penambahan konsentrasi pada saat penentuan *Limit of Quantification (LOQ)* praktik agar dapat meningkatkan signal yang ada.

Tabel 4. 6 *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantification (LOQ)* Praktik

| Parameter | Hasil | Batas keberterimaan |
|---|-----------------|------------------------------|
| <i>Limit of Detection (LOD)</i> | | |
| a. Konsentrasi injeksi | 0,0101 mg/L | $S/N \geq 3$ |
| b. <i>Limit of Detection (LOD)</i> | 0,34 mg/L | $S/N \geq 3$ |
| <i>Limit kuantitas (LOQ)</i> | | |
| a. Konsentrasi injeksi | 0,20 mg/L | $S/N \geq 10$ |
| b. \bar{X} % Recovery | 100,73 | 80 – 120% |
| c. % RSD | 1,48 | $\% RSD \leq 2/3$ CV Horwitz |
| d. 2/3 % CV Horwitz | 12,00 | - |
| e. <i>Limit of Quantification (LOQ)</i> | 6,71 mg/L | $S/N \geq 10$ |
| Kesimpulan | Memenuhi Syarat | |

Data yang diperoleh dari *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantification (LOQ)* praktik dapat dilihat pada Tabel 4.6. Pengukuran *Limit of Detection (LOD)* praktik dilakukan dengan preparasi blanko sampel yang dispike

analit dengan konsentrasi sesuai dengan nilai *Limit of Detection* (LOD) teoritis yaitu 0,0101 mg/L sehingga diperoleh kadar sebagai LOD praktik sebesar 0,34 mg/L dengan nilai $S/N \geq 3$, hal ini menunjukkan bahwa batas terkecil analit yang dapat terdeteksi adalah dengan kadar 0,34 mg/L.

Pengukuran *Limit of Quantification* (LOQ) praktik dilakukan dengan preparasi blanko sampel yang di spike analit dengan konsentrasi sesuai dengan nilai *Limit of Quantification* (LOQ) teoritis. *Limit of Quantification* (LOQ) teoritis diperoleh hasil sebesar 1,17 mg/L, namun hasil kadar yang diperoleh tersebut memiliki nilai $S/N < 10$ dan nilai $\% RSD > 2/3 \%$ CV Horwitz, menunjukkan hasil tersebut belum masuk dalam batas keberterimaan, maka konsentrasi harus dinaikkan hingga diperoleh nilai $S/N \geq 10$. Nilai S/N dipengaruhi oleh konsentrasi, semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi puncak dan luas area yang dihasilkan. Konsentrasi dinaikkan menjadi 0,20 mg/L hingga diperoleh kadar sebagai *Limit of Quantification* (LOQ) praktik yaitu sebesar 6,71 mg/L dengan nilai $S/N \geq 10$ dan $\% RSD \leq 2/3 \%$ CV Horwitz, menunjukkan hasil yang diperoleh sudah masuk dalam batas keberterimaan, hal ini menunjukkan batas terkecil analit yang dapat terkuantifikasi adalah dengan kadar 6,71 mg/L.

4.2.3. Penentuan Spesifitas (Selektivitas)

Spesifitas atau selektivitas merupakan kemampuan suatu alat yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel yang dapat mempengaruhi hasil pengujian. Spesifitas dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan. Uji spesifitas dilakukan dengan membandingkan hasil analisis larutan standar kafein dengan *matriks* selain kafein yang terkandung di dalam sampel (*interferens*) yaitu Ka sorbat, acesulfame, sucrolose, Na benzoat, Na siklamat. Hasil spesifitas dapat diperoleh dengan melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa kafein yang terpisah secara sempurna dengan *interferens*. Syarat keberterimaan spesifitas yaitu daya pisah (*resolusi*) sebesar $>1,5$.

Tabel 4. 7 Hasil Analisis Spesifitas

| Parameter | Kriteria | Hasil | Kesimpulan |
|---|---------------|--------|------------|
| | Keberterimaan | | |
| Resolusi Standar | Sebelum | > 1.50 | - |
| | Sesudah | > 1.50 | - |
| Resolusi Sampel | Sebelum | > 1.50 | 6,45 |
| | Sesudah | > 1.50 | 2,72 |
| Resolusi Sampel dengan <i>Interferens</i> | Sebelum | > 1.50 | 6,34 |
| | Sesudah | > 1.50 | 2,70 |

Berdasarkan tabel 4.7 hasil yang diperoleh dari resolusi standar tidak dihasilkan *peak* sebelum dan sesudah *peak* analit artinya pada standar kafein tidak terdapat pengotor yang dapat mengganggu standar kafein yang digunakan, untuk resolusi sampel didapatkan resolusi sebelum *peak* analit sebesar 6,45 dan resolusi sebelum sebesar 2,72 sedangkan resolusi sampel dengan *iterferens* didapatkan hasil resolusi sebelum *peak* analit sebesar 6,34 dan sesudah sebesar 2,70 menunjukkan bahwa kedua kromatogram dari sampel dan sampel dengan *interferens* dapat terpisah dengan baik karena hasil yang diperoleh memenuhi syarat keberterimaan yaitu >1,5.

Data yang dihasilkan dapat disimpulkan bahwa sampel minuman kopi positif mengandung kafein dan pada sampel tidak terkandung *matriks* pengganggu yang dapat mempengaruhi hasil pengujian, karena hasil yang diperoleh keseluruhan memenuhi syarat keberterimaan, sehingga sampel minuman kopi memenuhi persyaratan sampel uji. Artinya metode yang digunakan juga baik karena mampu mendeteksi, serta mengukur secara tepat dan spesifik analit dalam sampel meskipun sudah tercampur *matriks* lain yang terkandung dalam sampel.

4.2.4. Penentuan Presisi (Keseksamaan)

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis atau biasa disebut simpangan baku relatif (*Relative Standar Deviation*, RSD) (Abdul, 2014). Presisi dinyatakan sebagai *presentase Relative Standar Deviation* (% RSD). Pengujian presisi pada percobaan ini dilakukan oleh dua orang analis yang berbeda dan

peralatan yang berbeda namun dikerjakan pada laboratorium yang sama atau bisa disebut presisi antara. Presisi antara yaitu pengujian yang dilakukan oleh analis yang berbeda dan pada hari yang berbeda (Priyambodo, 2014). Presisi ini digunakan untuk memastikan apakah metode yang digunakan jika dilakukan oleh analis yang berbeda tetap menghasilkan hasil yang presisi. Penentuan presisi dilakukan dengan menginjektikan sampel minuman kopi dalam kemasan ke dalam instrumen KCKT kemudian dilakukan pembacaan sebanyak 10 kali. Kadar yang diperoleh dari masing-masing pengulangan kemudian ditentukan nilai % RSD.

Tabel 4. 8 Hasil Analisis Presisi

| No | % Kadar Kafein | |
|-----------|----------------|------------|
| | Analisis 1 | Analisis 2 |
| 1 | 274,72 | 273,32 |
| 2 | 274,81 | 271,28 |
| 3 | 275,06 | 271,41 |
| 4 | 270,64 | 271,20 |
| 5 | 271,34 | 271,58 |
| 6 | 272,96 | 271,06 |
| 7 | 271,17 | 263,43 |
| 8 | 274,34 | 272,56 |
| 9 | 271,23 | 271,00 |
| 10 | 272,51 | 271,15 |
| Rata-rata | 272,88 | 270,80 |
| SD | 1,73 | 2,69 |
| % RSD | 0,64 | 0,99 |

Berdasarkan Tabel 4.8 data hasil pengujian diperoleh % RSD analisis 1 sebesar 0,64% dan analisis 2 sebesar 0,99% sehingga menunjukkan nilai presisi tersebut memenuhi syarat keberterimaan presisi yaitu % RSD < 2% (Harmita, 2004). Semakin kecil nilai presisi yang diperoleh maka pengulangan yang dilakukan akan semakin baik. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki keterulangan yang baik dan menunjukkan kedekatan hasil uji antar pengulangan sehingga alat dapat bekerja secara optimum untuk menganalisis sampel minuman kopi.

4.2.5. Penentuan *Robustness* Volume Sampel (Ketegaran)

Pengujian ketegaran dilakukan untuk mengetahui kesetabilan metode analisis (tidak terpengaruh dari variasi yang diberikan) (Riyanto, 2014). Metode yang baik yaitu metode yang dapat stabil meskipun dilakukan perlakuan yang berbeda, hal ini akan menentukan kekuatan dari metode yang digunakan. Pada pengujian *robustness* volume sampel dilakukan perubahan variasi pipetasi volume sampel yang normalnya yaitu 3 mL, kemudian pipetasi dibuat variasi kurang dari volume normal yaitu 1 mL dan lebih dari volume normal yaitu 5 mL. Variasi pipetasi sampel dilakukan untuk mengetahui apakah jika pipetasi sampel kurang dari atau lebih dari volume normal yang telah ditetapkan masih diperoleh hasil yang presisi. Hasil pengujian *robustness* volume sampel dapat dilihat pada Tabel 4.9; 4.10 dan 4.11 :

Tabel 4. 9 Hasil Analisis *Robustness* Volume Sampel 1 mL

| Sampel | RT (menit) | Respon (Luas Area) | Konsentrasi injeksi (mg/L) | Kadar (mg/L) |
|---------------------|---------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------|
| Minuman Kopi 1 mL_1 | 8,13 | 103269,98 | 2,79 | 279,49 |
| Minuman Kopi 1 mL_2 | 8,11 | 101431,09 | 2,75 | 274,70 |
| Minuman Kopi 1 mL_3 | 8,12 | 101939,71 | 2,76 | 276,03 |
| Rata-rata (x) | | | | 276,74 |
| SD | | | | 2,47 |
| % RSD | | | | 0,89 |

Tabel 4. 10 Hasil Analisis *Robustness* Volume Sampel 3 mL

| Sampel | RT (menit) | Respon (Luas Area) | Konsentrasi injeksi (mg/L) | Kadar (mg/L) |
|---------------------|---------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------|
| Minuman Kopi 3 mL_1 | 8,09 | 311607,18 | 8,21 | 273,72 |
| Minuman Kopi 3 mL_2 | 8,08 | 315821,18 | 8,32 | 277,37 |
| Minuman Kopi 3 mL_3 | 8,09 | 310257,09 | 8,18 | 272,55 |
| Rata-rata (x) | | | | 274,55 |
| SD | | | | 2,52 |
| % RSD | | | | 0,92 |

Tabel 4. 11 Hasil Analisis *Robustness* Volume Sampel 5 mL

| Sampel | RT (menit) | Respon (Luas Area) | Konsentrasi injeksi (mg/L) | Kadar (mg/L) |
|---------------------|---------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------|
| Minuman Kopi 5 mL_1 | 8,06 | 518623,85 | 13,59 | 271,88 |
| Minuman Kopi 5 mL_2 | 8,06 | 515885,38 | 13,52 | 270,45 |
| Minuman Kopi 5 mL_3 | 8,06 | 516482,14 | 13,54 | 270,77 |
| Rata-rata (x) | | | | 271,03 |
| SD | | | | 0,75 |
| % RSD | | | | 0,28 |

Berdasarkan % RSD yang diperoleh dari hasil pengujian yaitu *robustness* volume sampel 1 mL didapatkan hasil sebesar 0,92%, *robustness* volume sampel 3 mL sebesar 0,92% dan *robustness* volume sampel 5 mL sebesar 0,28%. sehingga hasil *robustness* volume sampel 1 mL, 3 mL, 5 mL tersebut memenuhi syarat keberterimaan yaitu % RSD < 2% (Harmita, 2004). Hasil tersebut menunjukkan metode yang digunakan stabil meskipun dilakukan variasi volume sampel yang berbeda. Sehingga apabila pipetan volume sampel di bawah ataupun di atas volume normal maka masih menghasilkan data yang terjamin validitasnya.

Untuk lebih meyakinkan dan mengetahui hasil *robustness* volume sampel berbeda nyata atau tidak maka dilakukan interpretasi data dengan uji t, dengan membandingkan hasil rata-rata pipetan sampel volume normal dengan variasi pipetan sampel kurang dari volume normal (3 mL dengan 1 mL) dan rata-rata pipetan sampel volume normal dengan variasi pipetan sampel lebih dari volume normal (3 mL dengan 5 mL). Uji t (t-test) adalah salah satu bagian dari tes statistik yang digunakan untuk menguji benar atau tidaknya hipotesis nihil yang menyatakan bahwa diantara dua buah rata-rata (*mean*) sampel yang diambil secara acak dari populasi yang sama, tidak ada perbedaan yang signifikan (Sudiyono, 2009). Sampel yang digunakan pada uji robust volume sampel masih sama, namun perlakuannya berbeda dengan dilakukan variasi pipetan sampel, maka *paired sample t-test* merupakan metode yang tepat untuk digunakan dalam penentuan uji-t *robustness* volume sampel, dimana uji ini digunakan untuk membandingkan rata-rata (*mean*) dua variabel pada satu grup, namun

pelakuannya berbeda. Statistika uji ini digunakan dalam pengujian hipotesis. H_0 = tidak ada perbedaan rata-rata antara volume pemipetan sampel, artinya tidak ada perbedaan rata-rata yang signifikan, sedangkan H_1 = Terdapat perbedaan rata-rata antara volume pemipetan sampel. Hasil uji t volume sampel 3 mL dan 1 mL dapat dilihat pada Tabel 4.12 untuk volume sampel 3 mL dan 5 mL dapat dilihat pada Tabel 4.13.

Tabel 4. 12 Uji T *Robustness* Volume Sampel 3 mL dan 1 mL

| Parameter | Nilai/Hasil |
|------------------------------------|-------------|
| H_0 | Dierima |
| H_i | Ditolak |
| SD ² volume sampel 3 mL | 10,4816 |
| SD ² volume sampel 1 mL | 6,3267 |
| df | 4 |
| t-hitung | 1,851 |
| t-tabel | 2,77645 |

Tabel 4. 13 Uji T *Robustness* Volume Sampel 3 mL dan 5 mL

| Parameter | Nilai/Hasil |
|------------------------------------|-------------|
| H_0 | Diterima |
| H_i | Ditolak |
| SD ² volume sampel 3 mL | 10,4816 |
| SD ² volume sampel 5 mL | 1,8792 |
| df | 4 |
| t-hitung | 1,533 |
| t-tabel | 2,77645 |

Berdasarkan output yang dihasilkan dari *robustness* volume sampel 3 mL dan 1 mL nilai t hitung diperoleh hasil sebesar 1,851 dan t tabel sebesar 2,77645 untuk *robustness* volume sampel 3 mL dan 5 mL nilai t hitung diperoleh hasil sebesar 1,533 dan t tabel sebesar 2,77645. Hasil uji *robustness* volume sampel

diterima atau tidak berbeda nyata H_0 , jika t hitung $\leq t$ tabel. Menurut perhitungan secara statistika nilai t tabel yang didapatkan menunjukkan bahwa H_0 diterima. Artinya, volume sampel 3 mL dan 1 mL maupun 3 mL dan 5 mL hasil yang diperoleh tidak berbeda nyata.

4.2.6. Penentuan Akurasi (Kecermatan)

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan drajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Data yang diperoleh dilaporkan sebagai presentasi perolehan kembali (*% recovery*) (ICH, 2005). Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode standar adisi. Metode tersebut merupakan bagian dari teknik analisis kuantitatif yang dilakukan dengan menambahkan sederetan larutan standar yang telah diketahui jumlahnya ke dalam sampel. Pelaksanaanya yaitu dengan membagi sampel ke dalam berbagai bagian yang sama lalu ditambahkan standar dengan level konsentrasi yang meningkat (Riyanto, 2014). Penentuan akurasi dilakukan dengan cara mengukur standar area kerja, mengukur sampel tanpa spiking dan standar adisi pada konsentrasi 80%, 100% dan 120%, dari standar awal karena nilai konsentrasi yang digunakan mewakili nilai dari batas terkecil, batas tengah dan batas tertinggi dari konsentrasi yang telah dianjurkan dalam rentang presentase akurasi yaitu 3 macam konsentrasi, untuk memastikan perubahan konsentrasi yang dilakukan hasil akurasi yang diperoleh masih bagus, masing-masing diinjeksikan pada sistem KCKT sebanyak 7 kali ulangan.

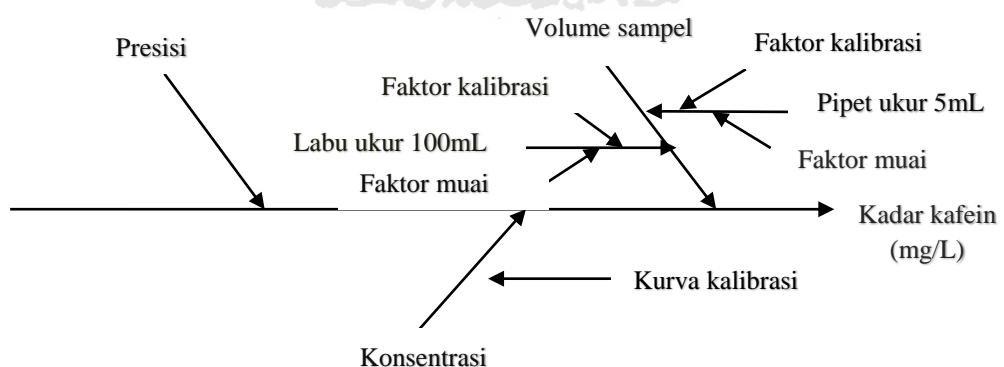
Tabel 4. 14 Standar Adisi Konsentrasi 80%, 100%, dan 120%

| Parameter | Hasil (% <i>Recovery</i>) | Kriteria keberterimaan (% <i>Recovery</i>) |
|------------------|-------------------------------|--|
| Konsentrasi 80% | 100,56 % | |
| Konsentrasi 100% | 99,97 % | 80% - 115% |
| Konsentrasi 120% | 100,37 % | |
| Rata - rata | 100,30% | |

Berdasarkan tabel 4.14 nilai rerata % *recovery* pada spike level konsentrasi 80%, 100%, dan 120% didapatkan hasil sebesar 100,30%. Nilai tersebut masuk dalam batas keberterimaan %*recovery* yaitu 80%-115% (Harmita, 2004).

4.3.7. Estimasi Ketidakpastian

Estimasi ketidakpastian merupakan parameter yang berhubungan dengan hasil uji pengujian atau kalibrasi yang memberikan gambaran penyebaran nilai-nilai pengujian. Estimasi ketidakpastian sebaiknya diterapkan dalam semua jenis pengujian dan/atau kalibrasi untuk menunjukkan data ketelitian hasil pengujian atau kalibrasi. Perhitungan pengukuran dalam estimasi ketidakpastian bertujuan untuk membuktikan bahwa data hasil pengujian terbukti akurat dan valid. Komponen penyumbang ketidakpastian dalam pengujian ini yaitu diantaranya adalah kurva kalibrasi, presisi, dan volume sampel. Masing-masing dari komponen ketidakpastian tersebut digambarkan dalam bentuk diagram tulang ikan (*fish bond*). Tahapan perhitungan estimasi ketidakpastian diantaranya Spesifikasi pengukuran, identifikasi sumber-sumber ketidakpastian, perhitungan ketidakpastian baku, perhitungan ketidakpastian gabungan dan ketidakpastian diperluas. Diagram tulang ikan ditunjukkan pada Gambar 4.3



Gambar 4. 3 Diagram Tulang Ikan Kadar Kafein (mg/L)

Berdasarkan gambar diagram tulang ikan diatas, menunjukkan ada 3 sumber ketidakpastian yang dapat mempengaruhi hasil uji kadar kafein dalam minuman kopi yaitu berasal dari volume sampel, presisi, dan konsentrasi.

Tabel 4. 15 Estimasi Ketidakpastian Baku Penentuan Kadar Kafein

| Sumber | Nilai (x) | Satuan | $\mu(x)$ | $\mu((x)/x)^2$ |
|--------------------------|-----------|--------|----------|-------------------------|
| Labu ukur | 100 | mL | 0,0874 | $7,64 \times 10^{-7}$ |
| Pipet ukur | 5 | mL | 0,0173 | $1,2014 \times 10^{-5}$ |
| Kurva kalibrasi | 12,66 | - | 0,0371 | $8,6059 \times 10^{-6}$ |
| Presisi | 8,19 | - | 0,0165 | $4,0417 \times 10^{-5}$ |
| Ketidakpastian gabungan | | | | 0,0037 |
| Ketidakpastian diperluas | | | | 0,0073 |

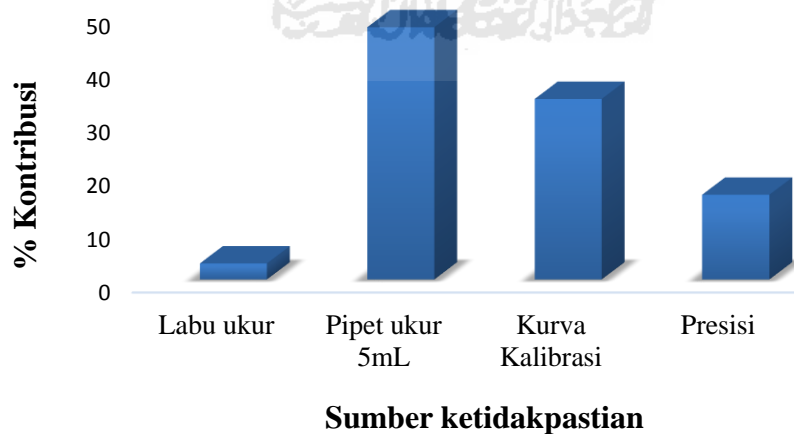
Berdasarkan tabel 4.15 Ketidakpastian gabungan penentuan kadar kafein diperoleh hasil sebesar 0,0037. Nilai ketidakastian gabungan tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan nilai ketidakpastian diperluas dengan selang kepercayaan 95% dan faktor cakupannya adalah 2, maka diperoleh nilai ketidakpastian diperluas sebesar 0,0073. Ketidakpastian menunjukkan rentang benar dari analisis. Nilai ketidakpastian pengukuran apabila dibandingkan dengan kadar yang didapatkan yaitu sebesar $272,88 \pm 0,0073$.

Tabel 4. 16 Kontribusi Ketidakpastian Pengukuran

| Sumber | Ketidakpastian baku | Kontribusi (%) |
|------------------|--------------------------|----------------|
| Labu ukur 100 mL | $7,647 \times 10^{-7}$ | 3,0074 |
| Pipet ukur 5 mL | $1,20147 \times 10^{-5}$ | 47,2516 |
| Kurva kalibrasi | $8,60598 \times 10^{-6}$ | 33,8457 |
| Presisi | $4,04167 \times 10^{-6}$ | 15,8951 |
| Jumlah | $2,5427 \times 10^{-5}$ | 100 |

Berdasarkan tabel 4.16 menunjukkan kontribusi terbesar penyumbang ketidakpastian dimulai dari pipet ukur 5 mL sebesar 47, 2516 %, kurva kalibrasi

sebesar 33,8457 %, presisi sebesar 15,8951 % dan kontribusi terkecil berasal dari labu ukur yaitu sebesar 3,0074 %. Untuk pipet ukur 5 mL menjadi penyumbang kontribusi terbesar pertama, kontribusi dimungkinkan dari proses pemipetan yang kurang tepat. Kontribusi penyumbang kedua yaitu berasal dari kurva kalibrasi yang dimungkinkan dari modifikasi konsentrasi larutan standar yaitu pada konsentrasi 2,03; 5,57; 9,12; 12,66; 16,21; 19,75 dan 23,30 mg/L, selain itu kontribusi juga berasal dari preparasi standar induk kafein sebesar 1000 mg/L kemudian diencerkan menjadi standar antara sebesar 100 mg/L hingga diperoleh deret standar yang menggunakan beberapa peralatan gelas. Kontribusi terbesar ketiga yaitu dari presisi, kontribusi dimungkinkan berasal dari preparasi sampel yang melalui beberapa tahapan yaitu seperti ekstraksi pelarut menggunakan alat sonikasi, preparasi menggunakan alat gelas sampai pada proses analisis menggunakan instrumen kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sedangkan untuk nilai penyimpangan dari volume labu tidak cukup signifikan mempengaruhi hasil pengujian yang disebabkan dari ketepatan analisis dalam menambahkan larutan tepat pada tanda batas labu ukur. Kontribusi ketidakpastian dapat dilihat dengan diagram batang pada Gambar 4.4



Gambar 4. 4 % Kontribusi Ketidakpastian

BAB V

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian validasi metode uji kafein dalam minuman kopi menggunakan KCKT di PT Saraswanti Indo Genetech Bogor dapat disimpulkan bahwa :

1. Komponen-komponen uji kesesuaian sistem didapatkan hasil % RSD dari *retention time* (RT) sebesar 0,5 % dan nilai % RSD dari luas area sebesar 0,95 % sehingga menunjukkan nilai presisi tersebut memenuhi syarat keberterimaan presisi yaitu % RSD < 2%, resolusi tidak didapatkan jarak antar kromatogram hal ini dikarenakan hanya standar kafein yang diukur pada parameter UKS, rata-rata faktor *tailing* sebesar 1,58 artinya hasil masuk dalam batas keberterimaan yaitu $T \leq 2$, rata-rata *Theoretical Plate* sebesar 5428,53 yang memenuhi persyaratan yaitu $N > 2000$. Berdasarkan komponen-komponen uji kesesuaian sistem yang diperoleh menunjukkan bahwa instrumen KCKT yang akan digunakan sudah berjalan dengan baik, efektif dan memberikan hasil analisis yang valid untuk pengujian validasi uji kafein dalam minuman kopi yang akan dilakukan.
2. Parameter validasi metode penentuan kafein dalam minuman kopi yang telah diuji memenuhi syarat keberterimaan sehingga metode dan prosedur kerja tersebut dapat digunakan untuk pengujian rutin, dengan persamaan regresi linier yang diperoleh yaitu $y = 39081x - 1254,3$ dan diperoleh linieritas yang baik dengan nilai koefisien korelasi $r = 0,9999$ ($r > 0,990$). *Limit of Detection* (LOD) yang didapatkan sebesar 0,34 mg/L dengan nilai $S/N \geq 3$, artinya hasil tersebut sudah memenuhi syarat keberterimaan. *Limit of Quantification* (LOQ) sebesar 6,71 mg/L yang memenuhi persyaratan yaitu didapatkan nilai $S/N \geq 10$. Spesifitas metode memenuhi syarat keberterimaan yaitu *resolusi* >1,5, resolusi sampel didapatkan sebelum *peak* analit sebesar 6,45 dan resolusi sebelum sebesar 2,72 sedangkan resolusi sampel dengan *iterferens* didapatkan hasil resolusi sebelum *peak* analit sebesar 6,34 dan sesudah sebesar 2,70.

Robustness volume sampel 1 mL didapatkan hasil sebesar 0,92%, *robustness* volume sampel 3mL sebesar 0,92% dan *robust* volume sampel 5 mL sebesar 0,28 % sehingga memenuhi syarat keberterimaan %RSD < 2% untuk meyakinkan apakah hasil *Robust* volume berbeda nyata atau tidak maka dilakukan uji t, nilai t hitung dari pemipetan sampel 3 mL dan 1 mL sebesar 1,851 dan t tabel sebesar 2,7764 untuk *robust* volume sampel 3 mL dan 5 mL nilai t hitung sebesar 1,533 dan t tabel sebesar 2,7764. Presisi metode memenuhi syarat keberterimaan dengan %RSD < 2% yaitu nilai %RSD analisis 1 sebesar 0,64% dan analisis 2 sebesar 0,99 %. Akurasi metode yang diperoleh memenuhi syarat keberterimaan dengan % *recovery* 80 %-115 % yaitu nilai rerata % *recovery* pada *spike* level konsentrasi 80 %, 100 %, dan 120 % didapatkan hasil sebesar 100,30 %. Ketidakpastian diperluas didapatkan hasil sebesar $272,88 \pm 0,0073$.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan saran yang diberikan yaitu sebaiknya perlu dilakukan uji terhadap parameter validasi lain, seperti uji ketangguhan metode (*Rogudnes*) untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh perbedaan dari operasional maupun lingkungan kerja pada hasil pengujian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul, R. (2014). *Validasi dan Penjaminan Mutu Metode Analisis Kimia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Afriliana, A. (2018). *Teknologi Pengolahan Kopi Terkini*. Yogyakarta: CV Budi Utama.
- Ahuja, S., and Dong, M. W. (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, Edisi Pertama*. Elsevier: United Kingdom.
- Anggrek, T. B. (2008). *29 Resep Kopi Nikmat*. Yogyakarta: Galangpress Group.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (2012). *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. 10th Edition. Washington DC.HA.
- Belitz, H.D, Grosch W, Schieberle P. (2009). *Food Chemistry 4th Edition*. Berlin (DE): Springer Verlag.
- Chan, C.C., H.L.Y. LEE dan Zhang. (2004). *Analytical Method Validation and Instrumen Perormance Verification* (ed). Jhon Willey and Shons, Inc Publication New Jersey.
- Day, R.A and Underwood, A.I. (1999). *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Airlangga.
- Ermer, J., J. h. McB. Miller. (2005). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice* (Eds). WILEY-VCH Verleg GmbH and Co. KgaA, Weinheim.
- Gandjar, I. G., dan Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis* . Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Hadjar, I., dan Rohman, A. (1985). Teknik Analisis Obat dalam Cairan Biologis dengan HPLC. *Cermin Dunia Kedokteran*, 26-31.
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Pharmaceuical Sciences and Research* .
- Hendrayana, S. (2006). *Kimia Pemisahan*. Bandung: Rosda.
- International Food Infoemation Council Foundation (IFIC). (2007, 30 Desember). Caffeine and Health: Clarifying The Contoversies. <http://www.ifif.org>.
- ICH. (2005). *Validation of Analytical Procedurs: Text and Methodology Q2 (R1)*. Chicago USA: International Conferece on Harmonization of Technical Requirements of Pharmaceuticals for Human Use.

- Ikrawan, Y. (2007, September 2). *Dampak Kafein untuk Kesehatan*. Diambil kembali dari Dampak Kafein untuk Kesehatan Web Site: <http://www.ific.org>
- Istiningrum, R., dan Kuntari. (2017). *Penuntun Praktikum Statistika Kimia*. Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia.
- Kantasubrata, Y. (2008). *Validasi Metoddedan Ketertelusuran Pengukuran Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*. Serpong: PTBN-BATAN.
- Karlida, I., dan Saputri, F. (2007). Review Derivatisasi Senyawa pada KCKT (Kromatografi Kinerja Tinggi) dengan Detektor Flouresensi. *Farmaka UNPAD*, 1-6.
- Kurniawan, A. (2014). *Validasi dan Penjaminan Mutu Metode Analis Kimia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Mayer, V.R. (2004). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 4th Edition. St. Gallen: Jhon Wiley and Shons.
- Murningsih, T., dan Chairul. (2000). Mengenal HPLC: Peranannya dalam Analisa dan Proses Isolasi Bahan Kimia Alam. *Berita Biologi*, 264-268.
- Najiyati, dan Danarti. (2004). *Kopi Budidaya dan Penanganan Lepas Panen. Edisi Revisi*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Olivia, F. (2012). *Khasiat Bombastis Kopi*. Jakarta: PT Elex Media Komputindo.
- Priyambodo, B. (2014, 09 22). *Validasi Metode Analisa (VMA)*. Diambil kembali dari wordpress.com: <http://priyambodo1971.wordpress.com>
- Rahardjo, P. (2012). *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Raharjo, P. (2012). *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Ramayulis, R. (2014). *Detox is Easy*. Jakarta: Penebar Swadaya Grup.
- Ridwan. (2006). *Dasar-Dasar Statistika*. Bandung: Alfabeta.
- Riyanto. (2014). *Validasi dan Verifikasi Metode Uji Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*. Yogyakarta: Deepublish.
- Rohman, A., dan Gholib, I. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Rohman, A., dan Gholib, I. (2012). *Analisi Obat Secara Spektrofotometri dan Kromatografi*. Yogyakarta: Pustaka pelajar.
- Rubiyanto, D. (2016). *Teknik Dasar Kromatografi*. Yogyakarta: CV Budi Utama.

- Siregar, S. (2014). *Bisnis Minuman Kopi Siap Minum yang Sangat Menggiurkan*. Diambil kembali dari Internet: <http://www.marsindonesia.com/newsletter/bisnis-minuman-kopi-siap-minum-yang-kian-menggiurkan>
- SNI 01-431314-1996. (1996). *Minuman Kopi dalam Kemasan*. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- Sudiyono, A. (2009). *Pengantar Statistik Pendidikan*. Jakarta: Rajawali Press.
- Suharti, T. (2017). *Dasar-dasar Spektrofotometri UV-VIS dan Spektrometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Bandar Lampung: CV Anugrah Utama Raharja.
- Susanti, M., dan Dachriyanus. (2006). *Kromatografi Kinerja Tinggi*. Sumatra Barat: Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi.
- Susanti, M., dan Dachriyanus. (2017). *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Padang: Carano Pustaka Universitas Andalas.
- Synder, L.R., Krikland, J.J., Dolan, J.W., (2010), *Introduction of Modern Liquid Chromatography*, 3rd edition, Jhon Wiley and Sons, Inc., New York,pp. XI, 40-42.
- Winarno dan Darsono. (2019). *Ekonomi Kopi Rakyat Robusta*, Jawa Timur: Uwais Inspirasi Indonesia.



LAMPIRAN

Lampiran 1 Pembuatan Larutan

1. Pembuatan Pb asetat 23%

$$\% \frac{b}{v} = \frac{\text{gram zat terlarut}}{\text{mL larutan}} \times 100\%$$

$$\% \frac{b}{v} = \frac{\text{gram zat terlarut}}{500 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$\% \frac{b}{v} = 115 \text{ g}$$

2. Penentuan Konsentrasi Standar Induk

Diketahui : Massa kafein standar = 25,32275 mg

Volume larutan = 25 mL = 0,025 L

Jawab :

$$ppm = \frac{mg}{L} = \frac{25,32275 mg}{0,025 L} = 1012,91 \text{ mg/L}$$

3. Penentuan Standar Antara

Diketahui :

Volume labu ukur = 10 mL

Volume pipet standar induk = 1 mL

Konsentrasi standar induk = 1012,91 mg/L

Jawab :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$M_2 = \frac{V_1 \times M_1}{V_2}$$

$$M_2 = \frac{1 \text{ mL} \times 1012 \text{ mg/L}}{10 \text{ mL}}$$

$$M_2 = 101,29 \text{ mg/L}$$

4. Perhitungan pembuatan deret standar kafein

- a. Larutan standar dengan konsentrasi 2,03 mg/L

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 101,29 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times 2,03 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,200 \text{ mL}$$

- b. Larutan standar dengan konsentrasi 5,57 mg/L

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 101,29 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times 5,57 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,550 \text{ mL}$$

- c. Larutan standar dengan konsentrasi 9,12 mg/L

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1012,91 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times 9,12 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,900 \text{ mL}$$

- d. Larutan standar dengan konsentrasi 12,66 mg/L

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1012,91 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times 12,66 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,125 \text{ mL}$$

- e. Larutan standar dengan konsentrasi 16,21 mg/L

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1012,91 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times 16,21 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,160 \text{ mL}$$

- f. Larutan standar dengan konsentrasi 19,75 mg/L

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1012,91 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times 19,75 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,195 \text{ mL}$$

- g. Larutan standar dengan konsentrasi 23,30 mg/L

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1012,91 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times 23,30 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,230 \text{ mL}$$

Lampiran 2 Penentuan UKS

| Sampel | RT (menit) | Respon (Luas Area) | Tailing Factor (T) | Teoritical Plate (N) | Resolusi | |
|------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|
| | | | | | Peak sebelum | Peak sesudah |
| 1 | 8,10 | 341129,79 | 1,56 | 5451,17 | - | - |
| 2 | 8,09 | 345785,58 | 1,59 | 5402,20 | - | - |
| 3 | 8,09 | 346637,23 | 1,54 | 5451,86 | - | - |
| 4 | 8,09 | 339212,26 | 1,56 | 5520,24 | - | - |
| 5 | 8,09 | 344471,53 | 1,57 | 5412,47 | - | - |
| 6 | 8,09 | 347401,46 | 1,65 | 5333,24 | - | - |
| Rata-rata | 8,09 | 344106,31 | 1,58 | 5428,53 | - | - |
| SD | 0,0041 | 3256,63 | | | | |
| % RSD | 0,05 | 0,95 | | | | |
| Kriteria | RSD | RSD | T | N | Resolusi | Resolusi |
| Penerimaan | <2,00% | ≤2,00% | ≤2,00 | ≥1000 | ≥1,5 | ≥1,5 |
| Hasil | 0,05 | 0,95 | 1,58 | 5428,53 | - | - |
| Kesimpulan | Memenuhi syarat | | | | | |

1. Penentuan Parameter Presisi dari *Retention Time* (RT)

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

$$SD = \sqrt{\frac{(8,10 - 8,09)^2 + (8,09 - 8,09)^2 + \dots + (8,09 - 8,09)^2}{6-1}}$$

$$SD = 0,0041$$

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$\% RSD = \frac{0,0041}{8,09} \times 100\%$$

$$\% \text{ RSD} = 0,05 \%$$

2. Penentuan Parameter Presi dari Luas Area

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

$$SD = \sqrt{\frac{(341129,79 - 344106,31)^2 + \dots + (347401,46 - 344106,31)^2}{6-1}}$$

$$SD = 3256,63$$

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$\% \text{ RSD} = \frac{03256,63}{344106,31} \times 100\%$$

$$\% \text{ RSD} = 0,95\%$$

Lampiran 3 Penentuan Spesifitas (Selektivitas)

a. Resolusi (Daya Pisah) *Peak* Analit dengan *Peak Non Target* pada Standar

| Sampel | RT (menit) | <i>Peak</i> Sebelumnya | | <i>Peak</i> Sesudahnya | |
|---------------|---------------|------------------------|----------|------------------------|----------|
| | | RT (menit) | Resolusi | RT (menit) | Resolusi |
| Standar 1 | 8,08 | - | - | - | - |
| Standar 2 | 8,08 | - | - | - | - |
| Standar 3 | 8,07 | - | - | - | - |
| Rata-rata (x) | 8,08 | - | - | - | - |

b. Resolusi (Daya Pisah) *Peak* Analit dengan *Peak Non Target* pada Sampel

| Sampel | RT (menit) | <i>Peak</i> Sebelumnya | | <i>Peak</i> Sesudahnya | |
|---------------|---------------|------------------------|----------|------------------------|----------|
| | | RT (menit) | Resolusi | RT (menit) | Resolusi |
| Sampel 1 | 8,06 | 5,83 | 6,43 | 9,21 | 2,76 |
| Sampel 2 | 8,07 | 5,84 | 6,42 | 9,17 | 2,63 |
| Sampel 3 | 8,06 | 5,82 | 6,49 | 9,18 | 2,78 |
| Rata-rata (x) | 8,06 | 5,83 | 6,45 | 9,19 | 2,72 |

c. Resolusi (Daya Pisah) Peak Analit dengan Peak Non Target pada Sampel dengan Interferens

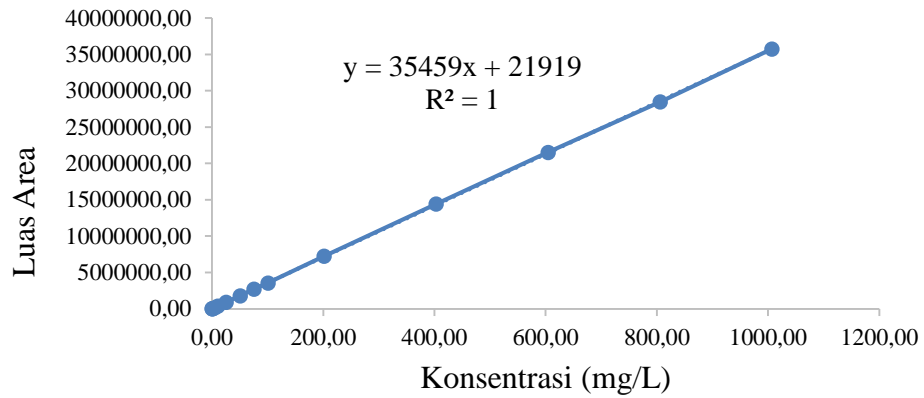
| Sampel | RT | Peak Sebelumnya | | Peak Sesudahnya | |
|---------------|---------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| | (menit) | RT (menit) | Resolusi | RT (menit) | Resolusi |
| Sampel 1 | 8,06 | 5,84 | 6,35 | 9,18 | 2,66 |
| Sampel 2 | 8,07 | 5,85 | 6,18 | 9,18 | 2,76 |
| Sampel 3 | 8,06 | 5,85 | 6,49 | 9,17 | 2,69 |
| Rata-rata (x) | 8,06 | 5,85 | 6,34 | 9,18 | 2,70 |

Lampiran 4 Penentuan Batas Linieritas

a. Tabel Penentuan Nilai Luas Area

| Konsentrasi standar (mg/L) (X) | Respon (Luas Area) (Y) |
|--------------------------------------|---------------------------|
| 0,20 | 7072,20 |
| 0,50 | 17920,52 |
| 1,01 | 35828,56 |
| 5,03 | 179464,40 |
| 10,07 | 360945,84 |
| 25,17 | 897645,90 |
| 50,35 | 1809970,38 |
| 75,52 | 2714217,26 |
| 100,69 | 3568745,89 |
| 201,39 | 7239982,00 |
| 402,78 | 14406709,53 |
| 604,16 | 21513107,95 |
| 805,55 | 28462767,18 |
| 1006,94 | 35729628,67 |
| Slope | 35458,7990 |
| Intercept | 21918,9204 |
| R ² | 1,0000 |
| R | 1,0000 |

b. Kurva Kalibrasi Batas Linieritas

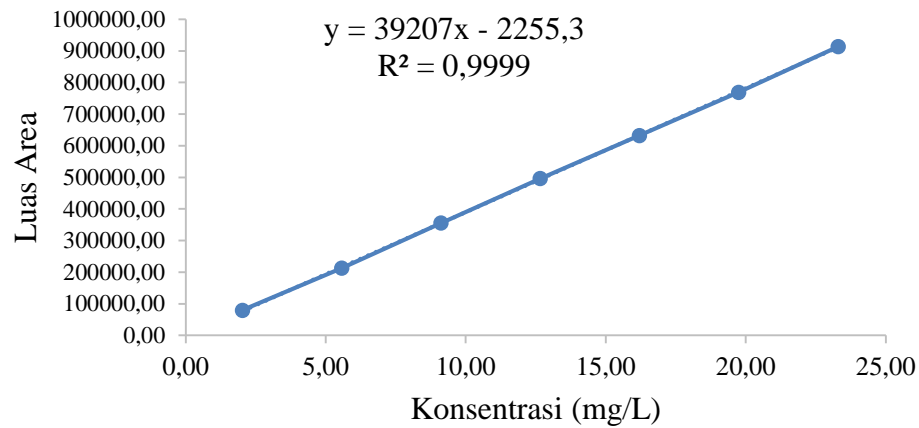


Lampiran 5 Penentuan Linieritas

a. Tabel Luas Area standar Kafein

| Konsentrasi Standar (mg/L) (x) | Luas Area (y) |
|-----------------------------------|------------------|
| 2,03 | 79375,40 |
| 5,57 | 212757,82 |
| 9,12 | 355554,36 |
| 12,66 | 496281,58 |
| 16,21 | 632607,77 |
| 19,75 | 769166,41 |
| 23,30 | 913388,18 |

b. Kurva Kalibrasi Linieritas



Lampiran 6 Penentuan *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantification* (LOQ)

a. Tabel penentuan *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantification* (LOQ) teoritis

| Sampel | S/N | Kons. Injeksi (mg/L) | Kadar (mg/L) |
|----------------------|------|----------------------|--------------|
| Spl Limit Teo 1 | 3,87 | 0,011 | 0,372 |
| Spl Limit Teo 2 | 3,05 | 0,010 | 0,333 |
| Spl Limit Teo 3 | 3,35 | 0,013 | 0,430 |
| Spl Limit Teo 4 | 3,48 | 0,016 | 0,535 |
| Spl Limit Teo 5 | 3,20 | 0,014 | 0,459 |
| Spl Limit Teo 6 | 3,93 | 0,009 | 0,302 |
| Spl Limit Teo 7 | 3,06 | 0,011 | 0,360 |
| Spl Limit Teo 8 | 3,96 | 0,019 | 0,633 |
| Spl Limit Teo 9 | 4,19 | 0,018 | 0,615 |
| Spl Limit Teo 10 | 4,25 | 0,011 | 0,367 |
| Rata-rata (x) | | 0,013 | 0,441 |
| Standar Deviasi (SD) | | 0,0035 | 0,1175 |
| % RSD | | 26,66 | 26,66 |
| CV Horwitz | | 30,68 | 18,10 |
| 2/3 CV Horwitz (%) | | 20,46 | 12,07 |
| LOD =3SD | | 0,0106 | 0,35 |
| LOQ =10SD | | 0,0352 | 1,17 |

1. Penentuan Standar Deviasi (SD)

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

$$SD = \sqrt{\frac{(0,372 - 0,441)^2 + (0,333 - 0,441)^2 + \dots + (0,367 - 0,441)^2}{10-1}}$$

$$SD = 0,1175$$

2. Penentuan % RSD

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$\% RSD = \frac{0,1175}{0,441} \times 100\%$$

$$\% RSD = 26,66\%$$

3. Penentuan 2/3 CV Horwitz (%)

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

$$CV \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log 0,441 \times 10^{-6})}$$

$$CV \text{ Horwitz} = 18,10$$

$$2/3 \text{ CV Horwitz (\%)} = \frac{2}{3} \times 18,10$$

$$2/3 \text{ CV Horwitz (\%)} = 12,07 \%$$

4. Penentuan LOD

$$LOD = 3 \times SD$$

$$LOD = 3 \times 0,1175$$

$$LOD = 0,35$$

5. Penentuan LOQ

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times 0,115$$

$$\text{LOQ} = 1,17$$

b. Tabel penentuan *Limit of Detection* (LOD) praktik

| Sampel | Konsentrasi injeksi (mg/L) | Kadar (mg/L) | Kadar <i>Spiking</i> LOD (mg/L) |
|------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| Spl LOD 1 | 0,0101 | 0,37 | 0,34 |
| Spl LOD 2 | 0,0101 | 0,33 | 0,34 |
| Spl LOD 3 | 0,0101 | 0,43 | 0,34 |
| Spl LOD 4 | 0,0101 | 0,53 | 0,34 |
| Spl LOD 5 | 0,0101 | 0,46 | 0,34 |
| Spl LOD 6 | 0,0101 | 0,30 | 0,34 |
| Spl LOD 7 | 0,0101 | 0,36 | 0,34 |
| Spl LOD 8 | 0,0101 | 0,63 | 0,34 |
| Spl LOD 9 | 0,0101 | 0,62 | 0,34 |
| Spl LOD 10 | 0,0101 | 0,37 | 0,34 |

1. Penentuan kadar spiking LOD

$$\text{Kadar LOD} = \frac{\text{Konsentrasi injeksi} \times \text{Volume labu}}{\text{Volume sampel}}$$

$$\text{Kadar LOD} = \frac{0,0101 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 100 \text{ mL}}{3 \text{ mL}}$$

$$\text{Kadar LOD} = 0,34 \text{ mg/L}$$

Kriteria Keberterimaan *Limit of Detection* (LOD) praktik

| Parameter | S/N | LOD |
|---------------------|-----------------|-----------|
| Kriteria Penerimaan | $S/N \geq 3$ | - |
| Hasil | > 3 | 0.34 mg/L |
| Kesimpulan | Memenuhi Syarat | |

c. Limit of Quantification (LOQ) praktik

Tabel Kadar *Spike* Teoritis Sampel Blanko Minuman Kopi

| Sampel | Konsentrasi injeksi (mg/L) | Kadar (mg/L) | Kadar Blanko (mg/L) | Kadar <i>Spike</i> LOQ (mg/L) | <i>Recovery</i> (%) |
|----------------|----------------------------|--------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|
| Spl LOQ 1 | 0,20 | 6,91 | 0,00 | 6,71 | 102,97 |
| Spl LOQ 2 | 0,20 | 6,67 | 0,00 | 6,71 | 99,40 |
| Spl LOQ 3 | 0,20 | 6,69 | 0,00 | 6,71 | 99,72 |
| Spl LOQ 4 | 0,20 | 6,63 | 0,00 | 6,71 | 98,82 |
| Spl LOQ 5 | 0,20 | 6,66 | 0,00 | 6,71 | 99,17 |
| Spl LOQ 6 | 0,20 | 6,90 | 0,00 | 6,71 | 102,74 |
| Spl LOQ 7 | 0,20 | 6,82 | 0,00 | 6,71 | 101,60 |
| Spl LOQ 8 | 0,20 | 6,83 | 0,00 | 6,71 | 101,78 |
| Spl LOQ 9 | 0,20 | 6,77 | 0,00 | 6,71 | 100,89 |
| Spl LOQ 10 | 0,20 | 6,73 | 0,00 | 6,71 | 100,22 |
| Rata-rata (x) | 0,20 | 6,76 | | | 100,73 |
| SD | | 0,1003 | | | |
| % RSD | | 1,48 | | | |
| 2/3 CV Horwitz | | 12 | | | |

1. Penentuan kadar *spiking* LOQ

$$\text{Kadar LOD} = \frac{\text{Konsentrasi injeksi} \times \text{Volume labu}}{\text{Volume sampel}}$$

$$\text{Kadar LOD} = \frac{0,20 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 100 \text{ mL}}{3 \text{ mL}}$$

$$\text{Kadar LOD} = 6,71 \text{ mg/L}$$

2. Penentuan Standar Deviasi (SD)

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{(Xi - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{(6,91 - 6,76)^2 + (6,67 - 6,76)^2 + \dots + (6,69 - 6,76)^2}{10 - 1}}$$

$$SD = 0,1003$$

3. Penentuan % RSD

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{X} \times 100\%$$

$$\% \text{ RSD} = \frac{0,1003}{6,76} \times 100\%$$

$$\% \text{ RSD} = 1,48 \%$$

4. 2/3 CV Horwitz (%)

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

$$CV \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log 6,76 \times 10^{-6})}$$

$$CV \text{ Horwitz} = 12$$

$$2/3 \text{ CV Horwitz (\%)} = \frac{2}{3} \times 12$$

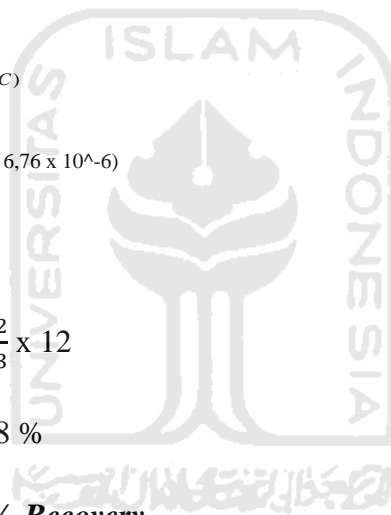
$$2/3 \text{ CV Horwitz (\%)} = 8 \%$$

5. Contoh perhitungan % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Kadar spike perolehan}}{\text{Kadar spike teoritis}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{6,91}{6,71} \times 100\%$$

$$\% \text{ Recovery} = 102,97$$



Lampiran 7 Penentuan Presisi

| No | % Kadar Kafein | |
|-----------|----------------|------------|
| | Analisis 1 | Analisis 2 |
| 1 | 274,72 | 273,32 |
| 2 | 274,81 | 271,28 |
| 3 | 275,06 | 271,41 |
| 4 | 270,64 | 271,20 |
| 5 | 271,34 | 271,58 |
| 6 | 272,96 | 271,06 |
| 7 | 271,17 | 263,43 |
| 8 | 274,34 | 272,56 |
| 9 | 271,23 | 271,00 |
| 10 | 272,51 | 271,15 |
| Rata-rata | 272,88 | 270,80 |
| SD | 1,73 | 2,69 |
| % RSD | 0,64 | 0,99 |

Analisis 1

1. Penentuan Standar Deviasi (SD)

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

$$SD = \sqrt{\frac{(274,72 - 272,88)^2 + (274,81 - 272,88)^2 + \dots + (275,06 - 272,88)^2}{10 - 1}}$$

$$SD = 1,73$$

2. Penentuan % RSD

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$\%RSD = \frac{1,73}{272,88} \times 100\%$$

$$\%RSD = 0,64 \%$$

Analisis 2

1. Penentuan Standar Deviasi (SD)

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

$$SD = \sqrt{\frac{(273,32 - 270,80)^2 + (271,28 - 270,80)^2 + \dots + (271,41 - 270,80)^2}{10 - 1}}$$

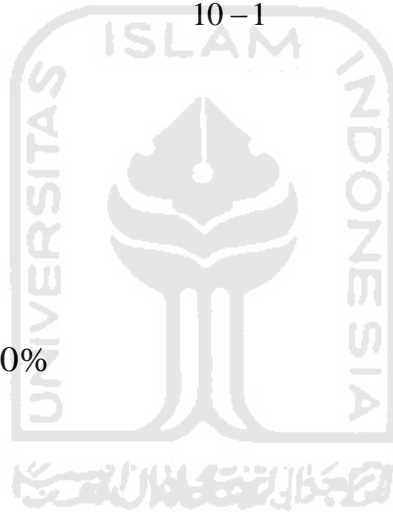
$$SD = 2,69$$

2. Penentuan % RSD

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$\% RSD = \frac{2,69}{270,80} \times 100\%$$

$$\% RSD = 0,99 \%$$



Lampiran 8 Penentuan *Robustness* Volume Sampel

➤ Penentuan % RSD

a. Volume Sampel 1 mL (Volume Min)

Volume sampel = 1 mL

Volume Akhir = 100 mL

Faktor Pengenceran (fp) = 1

| Sampel | RT (menit) | Respon (Luas Area) | Konsentrasi Injeksi (mg/L) | Kadar (mg/L) |
|---------------------|---------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------|
| Minuman Kopi 1 mL_1 | 8,13 | 103269,98 | 2,79 | 279,49 |
| Minuman Kopi 1 mL_2 | 8,11 | 101431,09 | 2,75 | 274,70 |
| Minuman Kopi 1 mL_3 | 8,12 | 101939,71 | 2,76 | 276,03 |
| Rata-rata (x) | | | | 276,74 |
| SD | | | | 2,47 |
| % RSD | | | | 0,89 |

1. Contoh Penentuan konsentrasi (mg/L) dan kadar (mg/L)

Pengulangan 1

$$\text{Konsentrasi Injeksi (mg/L)} = \frac{\text{LuasArea} - \text{Intersep}}{\text{Slope}}$$

$$\text{Konsentrasi Injeksi (mg/L)} = \frac{103269,98 - (-4225,5659)}{38461,9299}$$

$$\text{Konsentrasi Injeksi (mg/L)} = 2,79 \text{ mg/L}$$

2. Contoh Penentuan kadar (mg/L)

Pengulangan 1

$$\text{Kadar (mg/L)} = \frac{\frac{(\text{LuasArea} - \text{Intersep})}{\text{Slope}} \times \text{fp} \times \text{Vakhir}}{\text{Vsampel}}$$

$$\text{Kadar (mg/L)} = \frac{(103269,98 - (-4225,5659))}{38461,9299} \times 1 \times 100 \text{ mL}$$
$$\text{Kadar (mg/L)} = \frac{\quad}{1 \text{ mL}}$$

$$\text{Kadar (mg/L)} = 279,49 \text{ mg/L}$$

3. Penentuan Standar Deviasi (SD)

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

$$SD = \sqrt{\frac{(279,49 - 276,74)^2 + (274,70 - 276,74)^2 + (276,03 - 276,74)^2}{3-1}}$$

$$SD = 2,47$$

4. Penentuan %RSD

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$\% RSD = \frac{2,47}{276,74} \times 100\%$$

$$\% RSD = 0,89 \%$$

b. Volume Sampel 3 mL (Volume Normal)

Volume sampel = 3 mL

Volume Akhir = 100 mL

Faktor Pengenceran (fp) = 1

| Sampel | RT (menit) | Respon (Luas Area) | Konsentrasi injeksi (mg/L) | Kadar (mg/L) |
|---------------------|---------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------|
| Minuman Kopi 3 mL_1 | 8,09 | 311607,18 | 8,21 | 273,72 |
| Minuman Kopi 3 mL_2 | 8,08 | 315821,18 | 8,32 | 277,37 |
| Minuman Kopi 3 mL_3 | 8,09 | 310257,09 | 8,18 | 272,55 |
| Rata-rata (x) | | | | 274,55 |
| SD | | | | 2,52 |
| % RSD | | | | 0,92 |

1. Penentuan Standar Deviasi (SD)

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

$$SD = \sqrt{\frac{(273,72 - 274,55)^2 + (277,37 - 274,55)^2 + (272,55 - 274,55)^2}{3-1}}$$

$$SD = 2,52$$

2. Penentuan % RSD

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$\% \text{ RSD} = \frac{2,52}{274,55} \times 100\%$$

$$\% \text{ RSD} = 0,92\%$$

c. Volume Sampel 5 mL (Volume Max)

Volume sampel = 5 mL

Volume Akhir = 100 mL

Faktor Pengenceran (fp) = 1

| Sampel | RT | Respon | Konsentrasi | Kadar (mg/L) |
|---------------------|---------|-------------|-------------------|-----------------|
| | (menit) | (Luas Area) | injeksi (mg/L) | |
| Minuman Kopi 5 mL_1 | 8,06 | 518623,85 | 13,59 | 271,88 |
| Minuman Kopi 5 mL_2 | 8,06 | 515885,38 | 13,52 | 270,45 |
| Minuman Kopi 5 mL_3 | 8,06 | 516482,14 | 13,54 | 270,77 |
| Rata-rata (x) | | | | 271,03 |
| SD | | | | 0,75 |
| % RSD | | | | 0,28 |

1. Penentuan Standar Deviasi (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{(Xi - \bar{X})^2}{n - 1}} = 0,75$$

$$SD = \sqrt{\frac{(271,88 - 271,03)^2 + (270,45 - 271,03)^2 + (270,77 - 271,03)^2}{3 - 1}}$$

$$SD = 0,75$$

2. Penentuan %RSD

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$\% RSD = \frac{0,75}{271,03} \times 100\%$$

$$\% RSD = 0,28\%$$

➤ **Penentuan Uji T dari Robustness Volume Sampel**

a. Uji T dari Robustness Volume Sampel 1 mL dan 3 mL

| Ulangan | Kadar Volume sampel 1 mL (mg/L) | Ulangan | Kadar Volume sampl 3 mL (mg/L) |
|------------------|---------------------------------|------------------|--------------------------------|
| 1 | 266,43 | 1 | 273,72 |
| 2 | 271,99 | 2 | 277,37 |
| 3 | 272,08 | 3 | 272,55 |
| Rata-rata (XA) | 270,16 | Rata-rata (XB) | 274,55 |
| nA | 3 | nB | 3 |
| sd | 3,2375 | sd | 2,5153 |
| S ² A | 10,4816 | S ² B | 6,3267 |

1. Penentuan nilai sd pasangan

$$sd \text{ pasangan} = \sqrt{\frac{(nA - 1)s^2A + (nA - 1)s^2B}{nA + nB - 2}} \sqrt{\frac{1}{nA} + \frac{1}{nB}}$$

$$sd \text{ pasangan} = \sqrt{\frac{(3 - 1) \times 10,4816 + (3 - 1) \times 6,3267}{3 + 3 - 2}} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}$$

$$sd \text{ pasangan} = 2,3670$$

2. Penentuan nilai t hitung

$$t \text{ hitung} = \frac{XA - XB}{sd \text{ pasangan}}$$

$$t \text{ hitung} = \frac{270,16 - 274,55}{2,3670}$$

$$t \text{ hitung} = 1,8514$$

3. Penentuan t tabel

Taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 5\%$) dan $df = (n - k) = 6 - 2 = 4$, maka diperoleh t-tabel ($P = 95\%$, $df = 4$) = 2,7764

b. Uji T dari *Robustness* Volume Sampel 5 mL dan 3 mL

| Ulangan | Kadar Volume sampel 5 mL (mg/L) | Ulangan | Kadar Volume sampel 3 mL (mg/L) |
|------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|
| 1 | 273,80 | 1 | 273,72 |
| 2 | 273,67 | 2 | 277,37 |
| 3 | 271,36 | 3 | 272,55 |
| Rata-rata (XA) | 272,94 | Rata-rata (XB) | 274,55 |
| nA | 3 | nB | 3 |
| sd | 1,3709 | sd | 2,5153 |
| S ² A | 1,8792 | S ² B | 6,3267 |

1. Penentuan nilai sd pasangan

$$sd \text{ pasangan} = \sqrt{\frac{(nA - 1)s^2A + (nB - 1)s^2B}{nA + nB - 2}} \sqrt{\frac{1}{nA} + \frac{1}{nB}}$$

$$sd \text{ pasangan} = \sqrt{\frac{(3 - 1) \times 1,8792 + (3 - 1) \times 6,3267}{3 + 3 - 2}} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}$$

$$sd \text{ pasangan} = 1,6539$$

2. Penentuan nilai t hitung

$$t \text{ hitung} = \frac{XA - XB}{sd \text{ pasangan}}$$

$$t \text{ hitung} = \frac{272,94 - 274,55}{1,6539}$$

$$t \text{ hitung} = 0,9683$$

3. Penentuan t tabel

Taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 5\%$) dan $df = (n - k) = 6 - 2 = 4$, maka diperoleh t-tabel ($P = 95\%$, $df = 4$) = 2,7764

Lampiran 9 Penentuan Uji Akurasi

- Volume Sampel = 3 mL
- Konsentrasi Standar Induk = 1010,92 mg/L
- Kadar Sampel = 283,0625

a. Konsentrasi 80% dari standar Kafein

| Pengulangan | Kadar Sampel + Spike (mg/L) | Kadar Sampel tanpa Spike (mg/L) | Kadar Spike Teoritis (mg/L) | Kadar Spike Perolehan (mg/L) | Recovery (%) |
|-------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------|
| 1 | 495,20 | 280,02 | 226,45 | 215,18 | 95,02 |
| 2 | 506,18 | 276,59 | 226,45 | 229,59 | 101,39 |
| 3 | 510,13 | 278,21 | 226,45 | 231,91 | 102,41 |
| 4 | 502,91 | 270,30 | 226,45 | 232,61 | 102,72 |
| 5 | 508,61 | 283,31 | 226,45 | 225,30 | 99,49 |
| 6 | 513,62 | 282,21 | 226,45 | 231,40 | 102,19 |
| 7 | 504,83 | 276,89 | 226,45 | 227,95 | 100,66 |

Contoh perhitungan :

1. Perhitungan Kadar *Spiking* 80% dari kadar sampel 283,0625 mg/L

$$\text{Kadar } Spiking \text{ 80\%} = \frac{80}{100} \times \text{Kadar Sampel}$$

$$\text{Kadar } Spiking \text{ 80\%} = \frac{80}{100} \times 283,0625 \text{ mg / L}$$

$$\text{Kadar } Spiking \text{ 80\%} = 226,45 \text{ mg/L}$$

2. Perhitungan Volume Standar *Spiking*

$$\text{Volume } Spiking = \frac{\text{Kadar Sampel} \times \text{Volume Sampel}}{\text{Konsentrasi Standar Induk}}$$

$$\text{Volume } Spiking = \frac{226,45 \text{ mg/L} \times 3 \text{ mL}}{1010,92 \text{ mg/L}}$$

$$\text{Volume } Spiking = 0,67 \text{ mL}$$

3. Perhitungan Kadar *Spike* Teoritis

$$\text{Kadar } Spike \text{ Teoritis (mg/L)} = \frac{\text{Volume Standar } Spike \times \text{Konsentrasi Standar } Spike}{\text{Volume Sampel}}$$

$$\text{Kadar } Spike \text{ Teoritis (mg/L)} = \frac{0,67 \text{ mL} \times 1010,92 \text{ mg/L}}{3 \text{ mL}}$$

$$\text{Kadar } Spike \text{ Teoritis (mg/L)} = 226,45 \text{ mg/L}$$

4. Perhitungan Kadar *Spike* Perolehan

$$\text{Kadar } Spike \text{ Perolehan (mg/L)} = (\text{Kadar Sampel} + \text{Spike}) - \text{Kadar tanpa } Spike$$

$$\text{Kadar } Spike \text{ Perolehan (mg/L)} = 495,20 \text{ mg/L} - 280,02 \text{ mg/L}$$

$$\text{Kadar } Spike \text{ Perolehan (mg/L)} = 215,18 \text{ mg/L}$$

5. Perhitungan % *Recovery*

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Kadar } Spike \text{ Perolehan (mg/L)}}{\text{Kadar } Spike \text{ Teoritis (mg/L)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{215,18 \text{ mg/L}}{226,45 \text{ mg/L}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Recovery} = 95,02 \%$$

b. Konsentrasi 100% dari Standar Kafein

| Pengulangan | Kadar Sampel + Spike (mg/L) | Kadar Sampel tanpa Spike (mg/L) | Kadar Spike Teoritis (mg/L) | Kadar Spike Perolehan (mg/L) | Recovery (%) |
|-------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------|
| 1 | 561,06 | 280,02 | 283,06 | 281,04 | 99,29 |
| 2 | 563,21 | 276,59 | 283,06 | 286,62 | 101,26 |
| 3 | 561,17 | 278,21 | 283,06 | 282,96 | 99,97 |
| 4 | 546,75 | 270,30 | 283,06 | 276,46 | 97,67 |
| 5 | 566,64 | 283,31 | 283,06 | 283,33 | 100,10 |
| 6 | 568,30 | 282,21 | 283,06 | 286,09 | 101,07 |
| 7 | 561,23 | 276,89 | 283,06 | 284,35 | 100,45 |

Contoh perhitungan :

1. Perhitungan Kadar Spiking 100% dari kadar Sampel 283,0625 mg/L

$$\text{Kadar Spiking } 100\% = \frac{100}{100} \times \text{Kadar Sampel}$$

$$\text{Kadar Spiking } 100\% = \frac{100}{100} \times 283,0625 \text{ mg / L}$$

$$\text{Kadar Spiking } 100\% = 283,0625 \text{ mg/L}$$

2. Perhitungan Volume Standar Spiking

$$\text{Volume Spiking} = \frac{\text{Kadar Sampel} \times \text{Volume Sampel}}{\text{Konsentrasi Standar Induk}}$$

$$\text{Volume Spiking} = \frac{283,0625 \text{ mg/L} \times 3 \text{ mL}}{1010,92 \text{ mg/L}}$$

$$\text{Volume Spiking} = 0,84 \text{ mL}$$

3. Perhitungan Kadar Spike Teoritis

$$\text{Kadar Spike Teoritis (mg/L)} = \frac{\text{Volume Standar Spike} \times \text{Konsentrasi Standar Spike}}{\text{Volume Sampel}}$$

$$\text{Kadar Spike Teoritis (mg/L)} = \frac{0,84 \text{ mL} \times 1010,92 \text{ mg/L}}{3 \text{ mL}}$$

$$\text{Kadar Spike Teoritis (mg/L)} = 283,06 \text{ mg/L}$$

4. Perhitungan Kadar *Spike* Perolehan

$$\text{Kadar } \textit{Spike} \text{ Perolehan (mg/L)} = (\text{Kadar Sampel} + \textit{Spike}) - \text{Kadar tanpa } \textit{Spike}$$

$$\text{Kadar } \textit{Spike} \text{ Perolehan (mg/L)} = 561,06 \text{ mg/L} - 280,02 \text{ mg/L}$$

$$\text{Kadar } \textit{Spike} \text{ Perolehan (mg/L)} = 215,18 \text{ mg/L}$$

5. Perhitungan % *Recover*

$$\% \textit{ Recovery} = \frac{\text{Kadar } \textit{Spike} \text{ Perolehan (mg/L)}}{\text{Kadar } \textit{Spike} \text{ Teoritis (mg/L)}} \times 100\%$$

$$\% \textit{ Recovery} = \frac{281,04 \text{ mg/L}}{283,06 \text{ mg/L}} \times 100\%$$

$$\% \textit{ Recovery} = 99,29 \%$$

c. Konsentrasi 120% dari Standar Kafein

| Pengulangan | Kadar Sampel + <i>Spike</i> (mg/L) | Kadar Sampel tanpa <i>Spike</i> (mg/L) | Kadar <i>Spike</i> Teoritis (mg/L) | Kadar <i>Spike</i> Perolehan (mg/L) | <i>Recovery</i> (%) |
|-------------|------------------------------------|--|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| 1 | 606,02 | 280,02 | 339,67 | 326,00 | 95,98 |
| 2 | 619,52 | 276,59 | 339,67 | 342,93 | 100,96 |
| 3 | 610,06 | 278,21 | 339,67 | 331,84 | 97,70 |
| 4 | 613,46 | 270,30 | 339,67 | 343,16 | 101,03 |
| 5 | 630,84 | 283,31 | 339,67 | 347,53 | 102,31 |
| 6 | 631,25 | 282,21 | 339,67 | 349,04 | 102,76 |
| 7 | 622,87 | 276,89 | 339,67 | 345,99 | 101,86 |

Contoh perhitungan :

1. Perhitungan Kadar *Spiking* 120% dari kadar Sampel 283,0625 mg/L

$$\text{Kadar } \textit{Spiking} \text{ 120\%} = \frac{120}{100} \times \text{Kadar Sampel}$$

$$\text{Kadar } \textit{Spiking} \text{ 120\%} = \frac{120}{100} \times 283,0625 \text{ mg / L}$$

$$\text{Kadar } \textit{Spiking} \text{ 120\%} = 339,675 \text{ mg/L}$$

2. Perhitungan Volume Standar *Spiking*

$$\text{Volume Spiking} = \frac{\text{Kadar Sampel} \times \text{Volume Sampel}}{\text{Konsentrasi Standar Induk}}$$

$$\text{Volume Spiking} = \frac{339,675 \text{ mg/L} \times 3 \text{ mL}}{1010,92 \text{ mg/L}}$$

$$\text{Volume Spiking} = 1,00 \text{ mL}$$

3. Perhitungan Kadar *Spike* Teoritis

$$\text{Kadar Spike Teoritis (mg/L)} = \frac{\text{Volume Standar Spike} \times \text{Konsentrasi Standar Spike}}{\text{Volume Sampel}}$$

$$\text{Kadar Spike Teoritis (mg/L)} = \frac{1 \text{ mL} \times 1010,92 \text{ mg/L}}{3 \text{ mL}}$$

$$\text{Kadar Spike Teoritis (mg/L)} = 339,67 \text{ mg/L}$$

4. Perhitungan Kadar *Spike* Perolehan

$$\text{Kadar Spike Perolehan (mg/L)} = (\text{Kadar Sampel} + \text{Spike}) - \text{Kadar tanpa Spike}$$

$$\text{Kadar Spike Perolehan (mg/L)} = 606,02 \text{ mg/L} - 280,02 \text{ mg/L}$$

$$\text{Kadar Spike Perolehan (mg/L)} = 326 \text{ mg/L}$$

5. Perhitungan % *Recover*

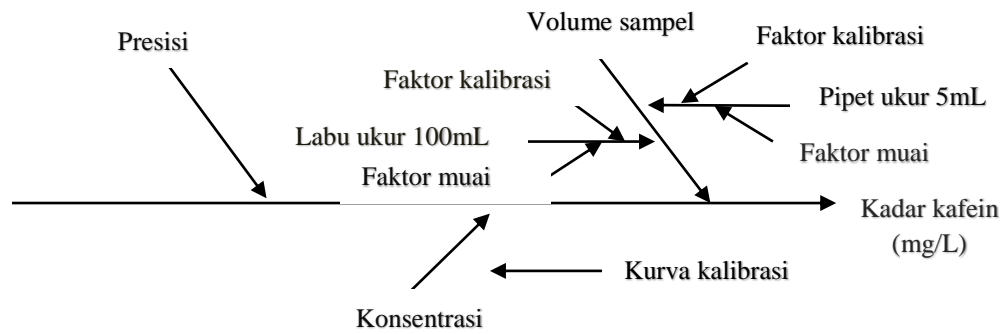
$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Kadar Spike Perolehan (mg/L)}}{\text{Kadar Spike Teoritis (mg/L)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{326 \text{ mg/L}}{339,67 \text{ mg/L}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Recovery} = 95,98 \%$$

Lampiran 10 Estimasi Ketidakpastian

1. Diagram tulang ikan



2. Ketidakpastian Baku

2.1. Ketidakpastian Volume Sampel

- Pipet ukur 5 mL $\pm 0,03$ mL

- Ketidakpastian Kalibrasi

$$\mu(V) = \frac{V}{\sqrt{K}} = \frac{0,03 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0,0173 \text{ mL}$$

- Ketidakpastian faktor muai

$$\begin{aligned} \mu(T) &= \frac{Vx\beta x\Delta T}{\sqrt{3}} \\ &= \frac{5x0,00021x-1}{\sqrt{3}} \end{aligned}$$

$$= -0,0006$$

- Ketidakpastian volume contoh

$$\begin{aligned} \mu(Vc) &= \sqrt{\mu(V)^2 + \mu(T)^2} \\ &= \sqrt{0,0173 + (0,0006)} \\ &= 0,01733 \end{aligned}$$

- Labu ukur 100 mL \pm 0,15 mL

➤ Ketidakpastian Kalibrasi

$$\mu(V) = \frac{V}{\sqrt{K}} = \frac{0,15\text{mL}}{\sqrt{3}} = 0,0866 \text{ mL}$$

➤ Ketidakpastian faktor muai

$$\begin{aligned} \mu(T) &= \frac{V\alpha\Delta T}{\sqrt{3}} \\ &= \frac{100 \times 0,00021 \times -1}{\sqrt{3}} \\ &= -0,0121 \end{aligned}$$

➤ Ketidakpastian volume contoh

$$\begin{aligned} \mu(V_c) &= \sqrt{\mu(V)^2 + \mu(T)^2} \\ &= \sqrt{0,0866^2 + (-0,0121)^2} \\ &= 0,0874 \end{aligned}$$

2.2. Ketidakpastian Kurva Kalibrasi

| NO. | X_i | Y_i | Y_c | $(Y_i - Y_c)^2$ | $(X_i - \bar{X})^2$ |
|-----------|-------|------------|-------------|-----------------|---------------------|
| 1 | 2,03 | 7375,40 | 77171,40321 | 4857601,83 | 113,12 |
| 2 | 5,57 | 212757,82 | 216168,1507 | 11630355,58 | 50,27 |
| 3 | 9,12 | 355554,36 | 355164,8982 | 151680,48 | 12,57 |
| 4 | 12,66 | 496281,58 | 494161,6457 | 4494121,38 | 0,00 |
| 5 | 16,21 | 632607,77 | 633158,3932 | 303185,92 | 12,57 |
| 6 | 19,75 | 769166,41 | 772155,1407 | 8932511,28 | 50,27 |
| 7 | 23,30 | 913388,18 | 911151,8882 | 5001000,95 | 113,12 |
| Jumlah | 88,63 | 3459131,52 | | 35370457,43 | 351,91 |
| \bar{X} | 12,66 | 494161,65 | | | |

Slope = 39207, 1916

Intersep = -2255, 3096

Jumlah Pengukuran Standar (n) = 7

Jumlah Pengukuran Sampel (m) = 10

Konsentrasi rata-rata Standar = 12,66

Konsentrasi rata-rata sampel = 8,19

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 2}}$$

$$= \sqrt{\frac{35370457,43}{10 - 2}}$$

$$= 2659,72$$

$$\text{Ketidakpastian kurva } (\mu(Cx)) = \frac{S_y}{\text{Slope} \cdot x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{\text{sampel}} - X_{\text{standar}})^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

$$= \frac{2659,72}{39207,1916} \sqrt{\frac{1}{10} + \frac{1}{7} + \frac{(8,19 - 12,66)^2}{351,91}}$$

$$= 0,04$$

2.3. Ketidakpastian Presisi

| Sampel | Konsentrasi (mg/L) | Kadar Mg/L |
|-----------------|--------------------|------------|
| Minuman Kopi 1 | 8,24 | 274,72 |
| Minuman Kopi 2 | 8,24 | 274,81 |
| Minuman Kopi 3 | 8,25 | 275,06 |
| Minuman Kopi 4 | 8,12 | 270,64 |
| Minuman Kopi 5 | 8,14 | 271,34 |
| Minuman Kopi 6 | 8,19 | 272,96 |
| Minuman Kopi 7 | 8,13 | 271,17 |
| Minuman Kopi 8 | 8,23 | 274,34 |
| Minuman Kopi 9 | 8,14 | 271,23 |
| Minuman Kopi 10 | 8,18 | 272,51 |
| Rata-rata (x) | 8,19 | 272,88 |
| SD (S) | 0,05 | 1,73 |
| Jumlah (n) | 10 | 0,64 |

$$\mu \text{ Presisi} = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{0,05}{\sqrt{10}} = 0,02$$

3. Ketidakpastian gabungan dari faktor penyumbang ketidakpastian

| Sumber | Nili (x) | Satuan | $\mu(x)$ | $\mu((x)/x)^2$ |
|------------------------------|----------|--------|----------|-------------------------|
| Labu ukur ($\mu(Vc)$) | 100 | mL | 0,0874 | $7,647 \times 10^{-7}$ |
| Pipet ukur ($\mu(Vc)$) | 5 | mL | 0,0173 | $1,2014 \times 10^{-5}$ |
| Kurva kalibrasi($\mu(Cx)$) | 12,66 | - | 0,0371 | $8,6059 \times 10^{-6}$ |
| Presisi ($\mu(p)$) | 8,19 | - | 0,0165 | $4,0416 \times 10^{-6}$ |
| Ketidakpastian gabungan | 0,0037 | | | |
| Ketidakpastian diperluas | 0,0073 | | | |

Ketidakpastian gabungan

$$\begin{aligned}
 (\mu(G)) &= \pm Cx \sqrt{(\mu(Vc))^2 + \mu(Vc)^2 + (\mu(p))^2 + (\mu(V))^2} \\
 &= \pm 272,88 \sqrt{7,647 \times 10^{-7} + 1,2014 \times 10^{-5} + 8,6059 \times 10^{-6} + 4,0416 \times 10^{-6}} \\
 &= 272,88 \pm 0,0037
 \end{aligned}$$

4. Ketidakpastian diperluas

Ketidakpastian diperluas dalam pentuan kadar kafein dalam minuman kopi ini menggunakan selang kepercayaan 95% sehingga faktor cakupannya adalah 2.

$$\begin{aligned}
 \text{Ketidakpastian diperrluas } (\mu) &= K \times (\mu(G)) \\
 &= 2 \times 0,0037 \\
 &= 0,0073
 \end{aligned}$$

5. Kontribusi ketidakpastian

| Sumber | $\mu((x)/x)^2$ | Kontribusi (%) |
|-----------------|-------------------------|----------------|
| Labu ukur | $7,647 \times 10^{-7}$ | 3,0074 |
| Pipet ukur | $1,2014 \times 10^{-5}$ | 47,2516 |
| Kurva kalibrasi | $8,6059 \times 10^{-6}$ | 33,8457 |
| Presisi | $4,0416 \times 10^{-6}$ | 15,8951 |
| Jumlah | $2,5427 \times 10^{-5}$ | 100 |

$$\begin{aligned}
 \text{Kontribusi (\%)} \text{ labu ukur } 100 \text{ mL} &= \frac{(\mu x / x)^2}{\sum} \times 100\% \\
 &= \frac{7,647 \times 10^{-7}}{2,5427 \times 10^{-5}} \times 100\% \\
 &= 3,0074 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kontribusi (\%)} \text{ ketidakpastian pipet ukur } 5 \text{ mL} &= \frac{(\mu x / x)^2}{\sum} \times 100\% \\
 &= \frac{1,2014 \times 10^{-5}}{2,5427 \times 10^{-5}} \times 100\% \\
 &= 47,251 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kontribusi (\%)} \text{ Kurva kalibrasi} &= \frac{(\mu x / x)^2}{\sum} \times 100\% \\
 &= \frac{8,6059 \times 10^{-6}}{2,5427 \times 10^{-5}} \times 100\% \\
 &= 33,8457 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kontribusi (\%)} \text{ presisi} &= \frac{(\mu x / x)^2}{\sum} \times 100\% \\
 &= \frac{4,0416 \times 10^{-6}}{2,5427 \times 10^{-5}} \times 100\% \\
 &= 15,8951 \%
 \end{aligned}$$