

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui kadar kafein dari beberapa suplemen pembakar lemak yang beredar dipasaran. Suplemen pembakar lemak merupakan salah satu produk yang digunakan untuk membantu pembakaran lemak dalam tubuh, salah satu kandungan yang terdapat didalamnya adalah kafein. Suplemen pembakar lemak didalam penelitian ini digunakan sebagai sampel yang dianalisis menggunakan metode KLT – Densitometri dan Spektrofotometri UV – Vis.

1. Pemisahan Kandungan Kafein

Tahap pertama yang dilakukan adalah pengujian KLT terhadap sampel dan standar murni kafein. Identifikasi menggunakan KLT dilakukan untuk mengetahui sampel yang digunakan terdapat kandungan kafein didalamnya, dengan membandingkan nilai Rf standar kafein dan nilai Rf dari setiap sampel. Pada tahap ini dilakukan preparasi sampel terlebih dahulu. Kandungan kafein di dalam suplemen diambil dengan cara pemisahan menggunakan metode corong pisah. Masing-masing sampel ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian sampel yang sudah ditimbang dimasukkan kedalam aquades sebanyak 100 ml dalam keadaan mendidih hingga larut sempurna. Menurut Wilson & Gisvold (1982) dalam Fitri (2008), kafein larut dalam 1,5 bagian air mendidih. Larutan sampel selanjutnya disaring menggunakan kertas saring, tahap ini bertujuan untuk menghilangkan zat pengotor dalam larutan sampel. Pada tahap hasil yang didapat adalah filtrat dari larutan

sampel tersebut. Filtrat yang sudah diperoleh ditambahkan 2 gram Na_2CO_3 , lalu dipanaskan sampai setengah campuran, dan didinginkan. Penambahan Na_2CO_3 bertujuan untuk mengikat tanin yang terlarut. Filtrat yang sudah ditambahkan Na_2CO_3 , dipekatkan dengan cara dipanaskan sampai setengahnya dan didinginkan (Fatoni, 2015). Setelah didinginkan filtrat yang sudah ditambah Na_2CO_3 dimasukkan kedalam corong pisah dan diekstraksi dengan kloroform berturut-turut sebanyak 25 ml dan dilakukan sebanyak empat kali. Pemisahan ini menggunakan pelarut kloroform karena kafein sangat mudah larut dalam kloroform (Farmakope ed. IV, 1995). Dalam penelitian oleh Djajanegara (2009), kloroform dapat melarutkan senyawa alkaloid. Kafein merupakan alkaloid, maka dengan penambahan kloroform akan memudahkan pelarutan kafein. Kemudian fase kloroform yang terdapat dibagian bawah seperti gambar no. 6 didiamkan hingga benar-benar memisah antara fase kloroform (dibawah) dengan fase air (diatas). Setelah fase kloroform sudah terpisah tahap selanjutnya adalah fase kloroform ditampung menggunakan wadah (gambar no. 7) dan diambil cuplikan kloroformnya untuk ditotolkan pada plat KLT.



Gambar 6. Salah satu contoh pemisahan pada sampel



Gambar 7. Salah satu contoh fase kloroform yang sudah didapatkan dari pemisahan

2. Uji Kualitatif dengan Metode KLT

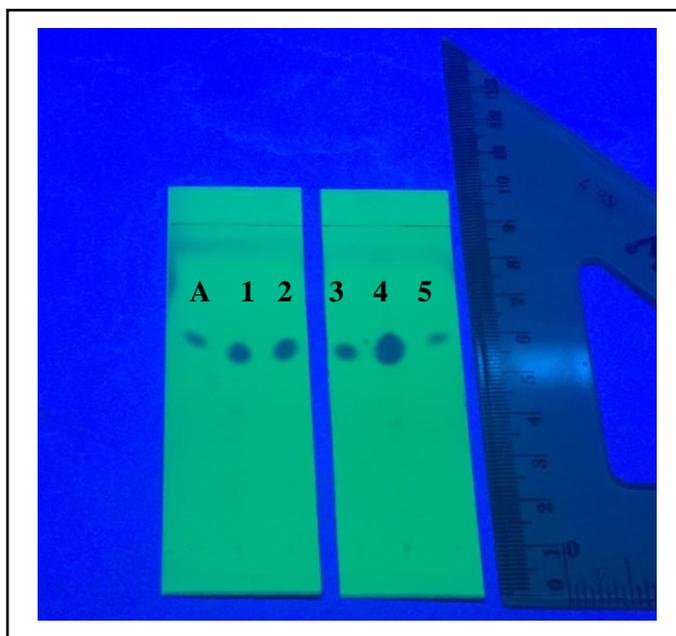
Tahap selanjutnya adalah identifikasi kafein menggunakan metode KLT. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu metode untuk menganalisis suatu senyawa secara kualitatif. Metode KLT lebih dikenal karena pelaksanaannya yang lebih sederhana dan lebih murah dibandingkan dengan kromatografi kolom (Gandjar dan Rohman, 2007). Metode KLT itu sendiri merupakan suatu proses pemisahan yang menggunakan fase diam berupa zat padat dan fase gerak berupa zat cair. Pemilihan fase gerak pada KLT harus memenuhi syarat memiliki kemurnian yang tinggi, daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f terletak antara 0,2 – 0,8, stabil, dan memiliki viskositas yang rendah. Peralatan dan bahan untuk melakukan metode KLT yang dibutuhkan untuk melakukan pemisahan dan analisis sampel cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup yang berisi lempeng dan pelarut (Wulandari, 2011).

Tahap pertama yang dilakukan sebelum identifikasi dengan KLT adalah penentuan dan optimasi fase gerak. Penentuan fase gerak yang akan dioptimasi mengacu pada penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya. Dalam penelitian Fatoni (2015) sudah dilakukan optimisasi beberapa fase gerak untuk identifikasi kafein dengan metode KLT. Pada tahap pemilihan fase gerak dalam penelitian ini mengacu pada hasil penelitian sebelumnya (Fatoni, 2015) yaitu menggunakan kloroform : etanol dengan perbandingan (9:1).

Prinsip kerja dari metode KLT adalah "*like dissolve like*", yang berarti suatu senyawa yang polar akan larut dalam pelarut yang polar dan sebaliknya senyawa yang non polar akan larut dalam pelarut non polar (Gandjar dan Rohman, 2007). Kloroform merupakan pelarut yang bersifat lebih non-polar dibandingkan dengan etanol. Langkah selanjutnya adalah penjenjuran untuk fase gerak. Tahapan ini bertujuan untuk memaksimalkan proses pergerakan spot dengan cara mendistribusikan fase gerak secara merata (Gandjar dan Rohman, 2007). Proses ini dilakukan dengan cara memasukkan fase gerak ke dalam chamber KLT yang sudah dibersihkan dan sudah diberi kertas indikator. Jika fase gerak telah mencapai ujung atas kertas indikator, maka fase gerak sudah jenuh.

Setelah dilakukan penjenjuran, plat KLT GF 254 yang sudah disiapkan, ditotolkan dengan baku dan sampel menggunakan pipa kapiler. Pengambilan baku dan sampel awalnya diambil sebanyak 0,5 ml menggunakan pipet volume dan dipindahkan ke cawan kemudian diambil menggunakan pipa kapiler atau sebesar 200 μ L dan ditotolkan pada tanda yang sudah dibuat di plat KLT. Plat tersebut dimasukkan ke dalam chamber atau bejana yang berisi fase gerak jenuh dan diamati

hingga fase gerak bergerak keatas hingga tanda kemudian dikeringkan dan dilakukan pengamatan dibawah sinar UV 254 nm seperti pada gambar no 8



Gambar 8. Hasil Identifikasi KLT

Selain itu kafein sendiri memiliki gugus kromofor dan auksokrom yang dapat mengabsorpsi sinar UV. Tahap selanjutnya adalah membaca totolan bercak pada plat KLT. Tahap ini dilakukan dengan cara mengamati bercak sampel dibandingkan dengan bercak baku kafein yang ada. Sesuai dengan ketentuan nilai R_f (*Retardation Factor*) yang ada bahwa nilai R_f yang dapat , dikatakan baik dan diterima pada nilai 0,2 sampai 0,8 (Gandjar dan Rohman, 2012).

Tabel 4. Hasil Kualitatif KLT

No.	Kode Sampel	Nilai R_f
1.	A (Kafein murni)	0,63
2.	Sampel no. 1 (HHE)	0,58
3.	Sampel no. 2 (CSHD)	0,59
4.	Sampel no. 3 (UR)	0,58
5.	Sampel no. 4 (HHNG)	0,55
6.	Sampel no. 5 (FBL-C)	0,65

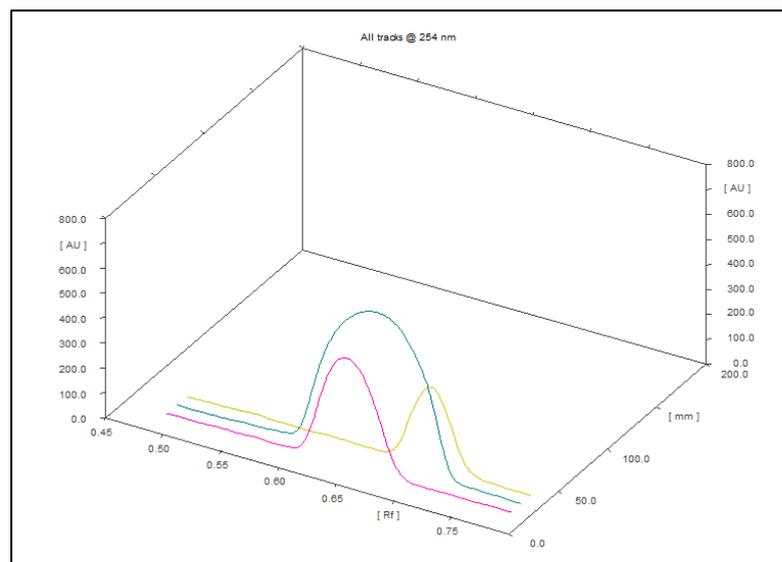
Plat KLT selanjutnya dibaca di bawah sinar UV 254 nm, sehingga dapat dianalisis dengan menghitung nilai Rf.. Hasil yang didapatkan, nilai Rf standar kafein dan sampel dituliskan pada tabel no 4. Nilai Rf didapatkan dengan membandingkan jarak yang di tempuh zat terlarut oleh sampel dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak pada plat KLT. Pada hasil identifikasi menggunakan KLT, spot yang ditandai dengan huruf (A) adalah spot baku kafein murni sedangkan spot yang ditandai angka 1 sampai 5 adalah sampel dari suplemen pembakar lemak. Pada baku kafein dapat dilihat bahwa terdapat spot jelas. Spot ini kemudian yang dijadikan sebagai standar spot baku kafein. Spot sampel yang terlihat sejajar dengan spot baku kafein dapat disimpulkan semua sampel benar-benar mengandung kafein.

Hasil tersebut sudah memenuhi ketentuan bahwa nilai Rf yang baik adalah 0,2 sampai 0,8. Pada penelitian ini baku kafein yang digunakan memiliki nilai Rf yang berbeda dari penelitian yang sudah pernah dilakukan, dikarenakan adanya perbedaan lingkungan penelitian yang dapat mempengaruhi hasil.

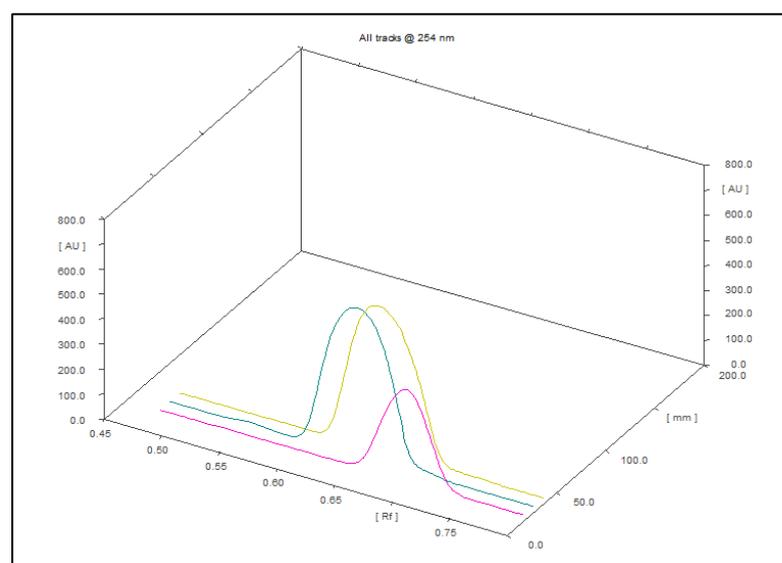
3. Uji Kuantitatif Metode KLT – Densitometri

Tahap selanjutnya adalah analisis menggunakan metode densitometri/*TLC Scanner*. KLT dianalisis menggunakan densitometer untuk mendeteksi nilai Rf dan panjang gelombang dari zat kafein itu sendiri. Metode densitometri merupakan salah satu metode untuk mengetahui kadar suatu zat yang sudah dianalisis menggunakan plat KLT. Prinsip kerja dari densitometri itu sendiri mengetahui luas area dan kromatogram pada plat KLT. KLT yang sudah berisi bercak noda sampel dimasukkan kedalam alat *TLC Scanner* untuk dilihat peak kromatogram dan luar

area (AUC) kromatogram yang terdapat dalam plat KLT tersebut. Plat KLT yang sudah mengandung kafein didalam suplemen pembakar lemak selanjutnya dihitung kadarnya menggunakan densitometri. Plat KLT tersebut dimasukkan kedalam densitometer dan dideteksi menggunakan sinar UV 254 nm. Hasil yang didapat berupa diagram *peak* luas sampel dan pembanding seperti pada gambar 9 dan 10, serta tabel yang menginformasikan luas area (AUC) sampel maupun pembanding.

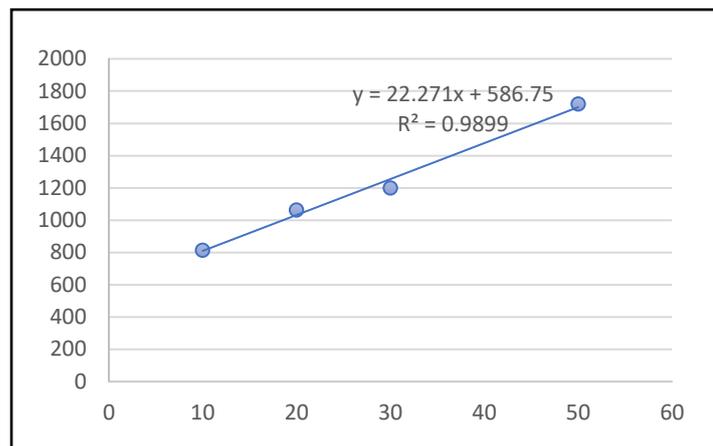


Gambar 9. Hasil Kromatogram Pembanding dan Sampel 1 – 2



Gambar 10. Hasil Kromatogram Sampel 3, 4, dan 5

Tahap selanjutnya adalah membuat persamaan linier dari kurva baku. Pada penelitian ini kurva baku yang digunakan adalah empat konsentrasi yang berbeda. Kurva baku tersebut digunakan untuk mendapatkan persamaan linier. Pada kurva ini sumbu x itu adalah konsentrasi dan sumbu y adalah luas area (AUC) seperti pada gambar 11.



Gambar 11. Kurva Baku Kafein Densitometri

Dari hasil tersebut didapatkan persamaan $y = 22,271x + 586,75$. Kemudian tahap selanjutnya adalah memasukkan nilai luas area yang sudah didapat dari hasil densitometri kedalam persamaan pada gambar no. 11, y adalah luas area (AUC) dan x adalah konsentrasi. Hasil luas area (AUC), konsentrasi kafein yang terkandung dalam suplemen pembakar lemak dan hasil dari pengukuran semua sampel pada penelitian ini dan sudah dimasukkan kedalam persamaan linier didapatkan bisa dilihat pada tabel no 5. Sampel 1 memiliki konsentrasi sebesar 1137,56 ppm, sampel 2 memiliki konsentrasi 1148,21 ppm, sampel 3 memiliki konsentrasi 687,87 ppm, sampel 4 memiliki konsentrasi 1781,30 ppm, dan sampel 5 memiliki konsentrasi 376,02 ppm. Tahap selanjutnya adalah konsentrasi yang sudah didapatkan, dikonversikan ke dalam satuan mg/ml dengan cara semua konsentrasi

sampel dalam bentuk satuan ppm dibagi dengan volume yang ditotolkan, volume yang ditotolkan adalah 200 μ L atau 0,2 ml. Konversi yang sudah dilakukan dapat dilihat di tabel no. 5

Tabel 5. Hasil Kuantitatif Densitometri

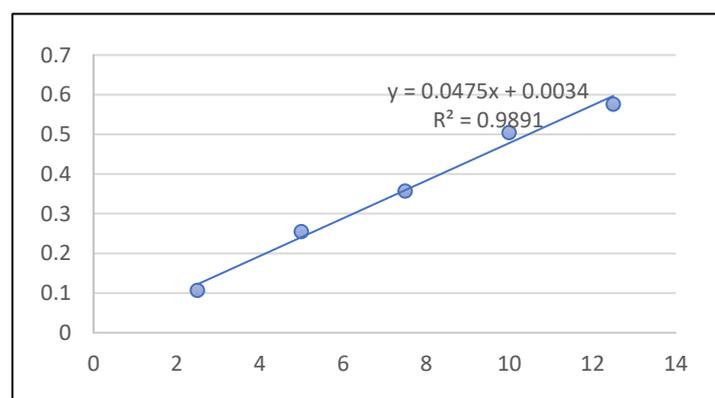
No.	Kode Sampel	Luas Area (AUC)	Konsentrasi sampel (ppm)	Kadar (mg/ml)
1.	Sampel no. 1 (HHE)	25921,4	1137,56	5,68
2.	Sampel no. 2 (CSDH)	26158,6	1148,21	5,74
3.	Sampel no. 3 (UR)/ Tergistrasi BPOM	15906,5	687,87	3,43
4.	Sampel no. 4 (HHNG)	40258,3	1781,30	8,90
5.	Sampel no. 5 (FBL-C)	8961,2	376,02	1,88

4. Uji Kuantitatif Metode Spektrofotometri UV – Vis

Tahap selanjutnya adalah analisis menggunakan metode spektrofotometri uv – vis. Identifikasi menggunakan Spektrofotometri UV – Vis adalah salah satu metode kualitatif dan kuantitatif untuk menganalisis suatu zat. Tahap pertama yang dilakukan pada metode ini adalah pembuatan larutan stok. Larutan stok yang digunakan adalah 100 ppm. Larutan stok dibuat bertujuan untuk menghindari penakaran ulang dan menghemat pekerjaan peneliti saat pengambilan konsentrasi dari setiap seri baku yang digunakan. Larutan stok yang sudah dibuat, diambil konsentrasi 5 ppm, dengan cara mengambil 5 ml larutan stok ke dalam labu ukur 100 ml menggunakan pipet volume. Larutan tersebut dilarutkan dengan aquades sampai tanda batas. Konsentrasi tersebut digunakan untuk mencari panjang gelombang maksimum dan diukur serapannya pada panjang gelombang antara 270-300 nm. Hasil dari pengukuran ini adalah 273,5 nm.

Tahap ini dilakukan untuk memberikan kepekaan maksimal terhadap sampel suplemen pembakar lemak yang mengandung kafein dan pada panjang gelombang maksimum bentuk kurva absorbansi memenuhi hukum Lambert-Beer. Menurut Farmakope Indonesia edisi IV, pengujian panjang gelombang maksimum tersebut tepat atau dalam batas 2 nm dari panjang gelombang yang ditentukan. Pengukuran panjang gelombang maksimum apabila dilakukan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil, ketika digunakan panjang gelombang maksimal (Gandjar dan Rohman, 2007). Berdasarkan hasil pengukuran didapatkan nilai panjang gelombang maksimum larutan standar kafein adalah 273,5 nm dengan nilai absorbansi 0,193. Hal tersebut sudah sesuai dengan yang dilaporkan Egan (1981), dalam Fitri (2008), panjang gelombang absorbansi maksimum berada pada rentang panjang gelombang 272-276 nm.

Tahap selanjutnya adalah pembuatan kurva persamaan linier. Kurva persamaan linier pada penelitian ini menggunakan lima seri baku dengan konsentrasi yang berbeda. Pada kurva ini sumbu x adalah konsentrasi dan sumbu y adalah absorbansi seperti pada gambar 12.



Gambar 12. Kurva Baku Kafein Spektrofotometri UV – Vis

Dari hasil ini didapatkan persamaan $y = 0,0457x + 0,0034$. Persamaan ini yang digunakan untuk mencari konsentrasi dari setiap sampel suplemen pembakar lemak. Tahap selanjutnya adalah pengukuran absorbansi dari setiap sampel. Pada tahap ini pengukuran absorbansi direplikasi tiga kali. Tahap ini dilakukan dengan cara, pelarut kloroform yang sudah ditampung di erlenmeyer, diuapkan dengan cara sublimasi pada cawan sehingga didapat kristal-kristal dari ekstrak kafein seperti pada gambar no. 13.



Gambar 13. Salah satu contoh pengkristalan pada sampel

Ekstrak kafein yang dihasilkan selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan dilarutkan dengan aquades sampai tanda batas, kemudian diukur absorbansinya pada spektrofotometri uv – vis. Sampel 1 memiliki nilai absorbansi 0,2947; 0,2980; dan 0,3009 dengan pengenceran 10 kali. Untuk sampel 2 memiliki nilai absorbansi 0,4308; 0,4154; dan 0,4170 dengan pengenceran 10 kali. Untuk sampel 3 memiliki nilai absorbansi 0,2096; 0,2059, dan 0,2079 dengan pengenceran 10 kali. Untuk sampel 4 memiliki nilai absorbansi 0,2255; 0,2299; dan 0,2292 dengan pengenceran 50 kali. Untuk sampel 5 memiliki nilai absorbansi 0,2462;

0,2473; dan 0,2553 tidak dilakukan pengenceran. Pada penelitian ini digunakan aquades bertujuan sebagai pengencer atau pelarut yang dengan penambahannya akan memperkecil konsentrasi larutan. Perlakuan pada sampel yang akan diuji menggunakan spektrofotometri uv – vis harus jernih dan tidak ada partikel asing, tujuannya agar alat dapat membaca absorbansinya dengan baik.

Absorbansi setiap sampel yang sudah didapatkan dari pengukuran tersebut, tahap selanjutnya adalah memasukkan kedalam persamaan linier yang sudah dibuat sebelumnya. Hasil dari persamaan tersebut dituliskan pada tabel no 6.

Tabel 6. Hasil Kuantitatif Spektrofotometri UV – Vis

No.	Kode Sampel	Absorbansi	Konsentrasi	Rata-rata Konsentrasi
1.	Sampel no. 1	0,2947	6,374	6,443
		0,2980	6,446	
		0,3009	6,509	
2.	Sampel no. 2	0,4308	9,352	9,139
		0,4154	9,015	
		0,4170	9,050	
3.	Sampel no. 3	0,2096	4,512	4,472
		0,2059	4,431	
		0,2079	4,474	
4.	Sampel no. 4	0,2245	4,838	4,491
		0,2299	4,956	
		0,2292	4,940	
5.	Sampel no. 5	0,2462	5,312	5,386
		0,2473	5,336	
		0,2553	5,512	

Hasil yang didapat pada sampel 1 konsentrasi yang diperoleh dengan rata-rata 6,443. Sampel 2 menunjukkan konsentrasi dengan rata-rata 9,139. Sampel 3 menunjukkan konsentrasi dengan rata-rata 4,472. Sampel 4 menunjukkan

konsentrasi dengan rata-rata 4,491, dan sampel 5 menunjukkan konsentrasi dengan rata-rata 5,386.

Tahap selanjutnya adalah penetapan kadar dari setiap sampel yang sudah dihitung konsentrasinya. Untuk penetapan kadar dilakukan dengan cara memasukkan hasil dari setiap konsentrasi yang sudah didapat kedalam rumus penetapan kadar, sebagai berikut:

$$\text{Kadar kafein (mg/g)} = \frac{\text{Konsentrasi (mg/L)} \times \text{Volume (L)} \times Fp}{\text{Berat Sampel (g)}}$$

Dari setiap konsentrasi dimasukkan kedalam rumus tersebut, kemudian dikalikan dengan volume yaitu 100 ml atau 0,1 L, dan dikalikan dengan faktor pengenceran dari setiap sampel dan dibagi dengan berat sampel, didapatkan hasil yang dituliskan pada tabel no 7.

Tabel 7. Penetapan Kadar Kafein

No.	Kode Sampel	Rata-rata Konsentrasi	Kadar (mg/g)
1.	Sampel no. 1 (HHE)	6,443	3,22
2.	Sampel no. 2 (CSHD)	9,139	4,56
3.	Sampel no. 3 (UR) / Tergistrasi BPOM	4,472	2,23
4.	Sampel no. 4 (HHNG)	4,491	11,22
5.	Sampel no. 5 (FBL-C)	5,386	0,26

Dari hasil perhitungan tersebut didapatkan dari setiap rata – rata konsentrasi setiap sampel didapatkan kadar, sampel 1 (HHE) 3,22 mg/g, sampel 2 (CSHD) 4,56 mg/g, sampel 3 (UR) yang sudah teregistrasi BPOM 2,23 mg/g, sampel 4 (HHNG) 11,22 mg/g, dan sampel 5 (FBL-C) 0,26 mg/g

5. Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini peneliti ini kurang melakukan dengan benar pada metode KLT – Densitometri, karena peneliti tidak melakukan dengan seksama pada pengukuran volume yang akan ditotolkan pada plat silica gel GF254 ditahap penotolan sampel saat metode kromatografi lapis tipis.