

# PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI UV VIS METODE DERIVATIF UNTUK ANALISIS KAFEIN DALAM SUPLEMEN

Dzurriatul Maghfiroh<sup>1</sup>, Eva Monica<sup>2</sup>, Muhammad Hilmi Afthoni<sup>3</sup>

Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Ma Chung, Malang, Indonesia

email korespondensi: [611710026@student.machung.ac.id](mailto:611710026@student.machung.ac.id)

## Abstrak

Suplemen merupakan produk kesehatan yang dapat dikonsumsi sehari-hari untuk memenuhi kebutuhan kesehatan tubuh. Dengan mayoritas bentuk sediaan berupa tablet atau serbuk, suplemen mengandung berbagai macam bahan aktif obat, seperti salah satu contohnya adalah kafein. Pada tahun 2004, Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) mengeluarkan surat keputusan HK.00.05.23.3644 yang menjelaskan tentang ketentuan pokok pengawasan suplemen makanan. Dalam keputusan tersebut, disebutkan bahwa batas maksimum konsumsi kafein adalah 150mg/hari, dan apabila dikonsumsi lebih dari 150mg/hari dapat menimbulkan efek samping.

Pada penelitian ini, dilakukan studi eksperimental dengan tujuan pengembangan dan validasi metode analisis secara spektrofotometri UV-Vis menggunakan metode derivatif, untuk menganalisis kafein dalam suplemen. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi pelarut dengan 4 kategori pemilihan pelarut dan yang terpilih adalah metanol dengan campuran asam sitrat kemudian dilakukan dengan menggunakan metode derivatif dengan plot  $dA/d\lambda$  dengan menggunakan panjang gelombang maksimum 239 nm, karena pada analisis ini terjadi pergeseran panjang gelombang yang sebenarnya. Untuk membuktikan validitas dari metode, digunakan parameter selektivitas, linearitas, presisi dan akurasi. Setelah dinyatakan validitasnya, dilakukan penetapan kadar kafein dalam suplemen.

Hasil penelitian dari analisis kafein dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan metode derivatif menunjukkan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,988; koefisien regresi linear ( $r$ ) sebesar 0,976 dengan p-value 0,0000546; batas deteksi 4,5 ppm; batas kuantifikasi 13,6 ppm; dan derajat penyimpangan sebesar 3,750%; dengan akurasi perolehan kembali sebesar 97,443%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode yang digunakan telah valid. Metode ini dapat digunakan dalam analisis kafein.

Kata kunci: Kafein, Metode Derivatif, Analisis, Suplemen Kesehatan, Spektrofotometri UV-Vis, Validasi Metode.

## Abstract

Supplements are health products that are consumed to meet the body's health needs. Usually shaped in dosage tablets or powder forms, it contains active ingredients, such as caffeine. In 2004, POM issued a decree of No. HK.00.05.23.3644 concerning 'Basic Provisions for Supervision of Food Supplements.' This decision states that the maximum limit of daily caffeine intake is 150 mg/day, and more than 150 mg/day consumption could cause side effects.

In this study, an experimental study was conducted to validate and develop the analysis of the method using UV-Vis spectrophotometry using the derivative method to analyze the caffeine in supplements. In this research, optimization of solvent from four categories has been done, and methanol was selected as

the solvent with the mixture of citric acid, and then carried out using a derivative method with  $dA/d\lambda$  by using a maximum wavelength of 239 nm because in this analysis there was a wavelength shift. The parameters for selectivity, linearity, precision, and accuracy were utilized to prove the validity of the method. After the validity was declared, the determination of caffeine content in the supplement was performed.

The result from caffeine analysis with spectrophotometry UV-Vis with derivatives method show a result of coefficient of determination ( $R^2$ ) 0.988; coefficient of correlation ( $r$ ) 0.976 with p-value  $5,46 \times 10^{-5}$ ; limit of detection 4,5ppm; limit of quantification 13,6ppm; and degree of deviation 3.750% with an accuracy of 97.443%. These results conclude that the method was valid. This method can be used for caffeine analysis.

Keywords: Caffeine, Derivatives Method, Spectrophotometry UV-Vis, Supplement, Validation of Method.

## Pendahuluan

Suplemen merupakan produk kesehatan yang dikonsumsi untuk kebutuhan sehari-hari untuk memenuhi kebutuhan kesehatan tubuh. Suplemen mengandung satu atau lebih zat yang bersifat nutrisi atau obat seperti vitamin mineral dan asam-asam amino. Dalam pengobatan konvensional yang dimaksud dengan suplemen juga termasuk obat yang menghambat nafsu makan, obat menurunkan lemak, dan obat yang memperbaiki gizi penyegar tubuh, pembangkit tenaga dan suplemen adalah dalam bentuk sediaan tunggal atau kombinasi untuk mendapatkan efek pengobatan tertentu (Hidayah, 2013). Suplemen, sesuai dengan namanya hanya bersifat menambahkan atau melengkapi. Ketika tubuh memberikan sinyal tanda bahaya adanya suatu ketidakberesan, maka pada saat itu kita mulai mempertimbangkan konsumsi suplemen untuk membantu mengatasinya. Misalnya; ketika sedang lesu, letih, lelah, sariawan, gusi berdarah dan sebagainya. Hal-hal di atas termasuk tanda-tanda seseorang mengalami kekurangan vitamin. Faktor lain yang menyebabkan seseorang mengkonsumsi suplemen makanan adalah kondisi lingkungan yang buruk, misalnya tingkat pencemaran yang tinggi dimana kadar radikal bebas semakin meningkat (Desiplia et al., 2018).

Penggunaan suplemen biasanya berbentuk dalam sediaan tablet maupun serbuk yang mengandung bahan aktif obat salah satunya bahan aktif kafein. Kafein merupakan senyawa alkaloid yang termasuk dalam golongan heterosiklik yang mengandung satu molekul air mengandung tidak kurang dari 98% dan tidak lebih dari 101,0 % dihitung terhadap zat anhidrat (DepKes, 2014).

Pada tahun 2004, Badan POM mengeluarkan Surat Keputusan Kepala Badan POM No. HK.00.05.23.3644 tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan. Dalam keputusan ini, disebutkan bahwa batas konsumsi kafein maksimum adalah 150 mg/hari dibagi minimal dalam 3 dosis (BPOM, 2016). Analisis mutu sediaan suplemen diperlukan untuk mengetahui kadar pada komposisi obat yang sesuai persyaratan. Di dalam metode kompendial Farmakope edisi V uji kafein menggunakan kromatografi yang membutuhkan biaya yang lebih dan waktu yang panjang sehingga dalam penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan uji pada kafein menggunakan spektrofotometri derivatif. Pada penetapan kadar suplemen atau sediaan multikomponen dapat digunakan dalam metode titrimetri seperti pada penelitian analisis penentuan ammonium chloride dalam obat batuk hitam dan kromatografi cair pada penelitian analisis parasetamol, salisilamida dan kafein dalam tablet. Sejalan dengan berkembangnya ilmu pengetahuan spektrofotometri derivatif dapat digunakan untuk menentukan kadar campuran suatu sediaan obat prinsip analisisnya dengan regresi ganda melalui perhitungan operasi matrik dengan pengamatan pada panjang gelombang atau panjang gelombang ganda. Metode spektrofotometri derivatif digunakan karena dapat dilakukan dengan lebih sederhana dengan waktu analisis yang lebih cepat dan biaya yang diperlukan lebih murah. Penelitian analisis kadar campuran metode spektrofotometri derivatif sudah pernah dilakukan pada penelitian analisis campuran parasetamol dan ibuprofen. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan metode baru yaitu metode spektrofotometri metode derivatif yang menganalisis kafein di dalam suplemen tanpa harus melakukan pemisahan dengan waktu yang cepat, efektif dan ekonomis dan untuk mengetahui pengaruh pergeseran panjang gelombang pada analisis kafein.

### Tinjauan Pustaka

Suplemen adalah produk kesehatan yang mengandung satu atau lebih bahan yang bersifat nutrisi suplemen dikemas dalam bentuk kapsul, tablet, serbuk atau cairan yang berfungsi sebagai pelengkap kekurangan gizi dalam tubuh. Suplemen digolongkan sebagai nutraceutical, oleh karena itu suplemen dijual bebas karena untuk memenuhi kebutuhan (Valavanidis, 2016). Suplemen makanan dapat didefinisikan sebagai vitamin, mineral, zat kimia, produk herbal, tumbuhan, asam amino, atau olahan yang dapat dimakan lainnya. Suplemen dapat ditambahkan ke makanan untuk memberi manfaat bagi kesehatan manusia. Suplemen makanan digunakan di seluruh dunia dan mewakili kategori produk yang dapat dimakan yang dapat dibedakan dari makanan dan obat-obatan konvensional (Watson 2011). Nutrisi merupakan peran yang sangat penting kesehatan. Diet sehat adalah salah satu yang disukai. Diet seimbang adalah campuran makanan dari berbagai kelompok makanan (sayuran, kacang-kacangan, buah-buahan, biji-bijian, makanan protein, daging, dan susu) (Howard Staunton, 2010).

Terdapat beberapa jenis suplemen makanan yang beredar di masyarakat, penggolongan suplemen makanan berdasarkan fungsinya dibedakan sebagai berikut:

- a. Obat metabolit untuk menghambat nafsu makan (anoreksigenikum) Anoreksigenikum mempunyai indikasi menghambat nafsu makan sehingga diklaim dapat menurunkan berat badan dan biasanya berisi bahan aktif dari ekstrak teh hijau atau ekstrak buah sena.
- b. Obat untuk menurunkan lemak dan kolestrol (antilipidemikum) Antilipidemikum yang mempunyai indikasi untuk mencegah penyakit-penyakit yang timbul akibat tingginya kadar lemak dalam darah kolesterol di dalam tubuh.
- c. Pembangkit tenaga dan memperbaiki sistem metabolisme. Suplemen makanan untuk pembangkit tenaga ini mengandung vitamin-vitamin mineral dan sari-sari tumbuhan ginseng dan jahe dan juga terdapat bahan aktif seperti kafein.
- d. Obat untuk memperbaiki status gizi Dietikum yang memiliki indikasi menambah berat badan maupun peningkatan nafsu makan.

Kafein memiliki struktur seperti pada gambar 2.1. Kafein merupakan senyawa alkaloid yang termasuk dalam golongan heterosiklik yang mengandung satu molekul air mengandung tidak kurang dari 98% dan tidak lebih dari 101,0 % dihitung terhadap zat anhidrat, pemerian serbuk. putih mengkilat tidak berbau mempunyai rasa pahit (DepKes, 2014). Kelarutan kafein dalam tetrahydrofuran yang mengandung kira-kira 4% air; larut dalam etil asetat larut 1:46, 1:1,5 air mendidih, 1:66 alkohol, 1:22 alkohol pada 60° C, 1:50 aseton, 1:5,5 kloroform, 1:530 eter, 1:100 benzena, 1:22 pendidihan benzena; sedikit larut dalam petroleum eter. Kelarutan dalam air meningkat dengan alkali benzoat, sinamat, sitrat atau salisilat. pKa 10.4 absorbansi maksimum 273 nm dan A11 504 (Clarke, 1986).

Metode spektrofotometri UV-Vis merupakan metode yang digunakan untuk menetapkan kadar senyawa obat dalam jumlah tertentu. Metode spektrofotometri didasarkan pada penggunaan nilai absorbansi suatu senyawa yang diukur pada konsentrasi 1% b/v (1g/100mL) dan dengan kuvet yang mempunyai ketebalan 1 cm pada panjang gelombang pelarut tertentu. Pada spektrofotometri UV-Vis, spektrum elektromagnetik dibagi dalam beberapa daerah cahaya. Dalam suatu daerah tersebut akan diabsorpsi oleh atom maupun molekul dan panjang gelombang cahaya yang diabsorpsi akan menunjukkan struktur senyawa yang diuji. Hal-hal yang harus diperhatikan dalam analisis secara spektrofotometri adalah:

1. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis
2. Waktu operasional
3. Pemilihan panjang gelombang
4. Pembuatan kurva baku
5. Pembacaan absorbansi (Gandjar & Rohman, 2012).

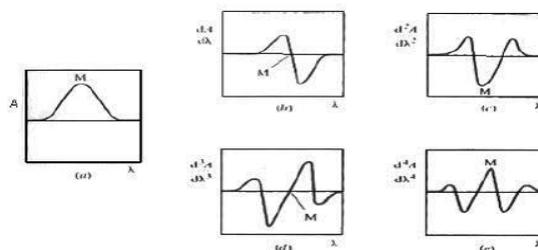
Terikatnya gugus auksokrom pada kromofor akan menyebabkan pergeseran absorbansi ke derivat gelombang maksimum dengan efek hiperkromik dan sebaliknya. Efek batokromik atau pergeseran merah adalah terjadi perubahan



derivat panjang gelombang ke arah panjang gelombang yang lebih besar, hal ini terjadi karena adanya substituen atau aoksokrom yang terdapat di dalam kromofor, misalnya pada pengukuran dari benzena, derivatif akan lebih besar dibanding panjang gelombang benzena atau dapat juga terjadi karena ada perubahan pelarut (Suhartati, 2017).

Efek hipsokromik atau pergeseran biru merupakan terjadinya perubahan absorpsi panjang gelombang yang lebih pendek karena terjadi perubahan pelarut atau tidak adanya substituen atau aoksokrom pada suatu kromofor. Efek hipokromik merupakan penurunan intensitas absorpsi dan peningkatan intensitas absorpsi. Hal ini terjadi karena perubahan pergeseran pada panjang gelombang atau intensitasnya. Efek batokromik dan hipsokromik dapat juga disebabkan karena perbedaan pelarut yang digunakan untuk senyawa yang dapat mengalami eksitasi  $\pi \rightarrow \pi^*$  dan mengalami eksitasi.

Metode spektrofotometri derivatif ultraviolet merupakan kombinasi antara spektrofotometri UV konvensional dan kemometri yang menggunakan peralatan optik, elektronik, dan metode matematika untuk menghasilkan spektrum turunan. Spektra UV dapat dilakukan secara diferensiasi (penurunan). Spektra derivatif dapat digunakan untuk mengklarifikasi atau menjelaskan pita-pita serapan dalam spektra UV yang lebih kompleks. Metode spektrofotometri derivatif merupakan metode manipulasi terhadap spektra yang ada pada spektrofotometri UV-vis. Pada gambar 2.2. menunjukkan bahwa suatu puncak serapan pertama (1<sup>st</sup>), kedua (2<sup>nd</sup>), ketiga (3<sup>rd</sup>), keempat (4<sup>th</sup>). Pada spektra pada derivatisasi pertama, resolusi akan ditingkatkan karena perubahan gradien yang sedang diamati (Gandjar dan Rohman, 2012). Pada spektrofotometri konvensional atau derivatif ke nol, spektrum serapan merupakan plot serapan atau absorbansi yang berhubungan dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ). Pada metode derivatif, untuk derivatif pertama ditransformasikan menjadi plot  $dA/d\lambda$  sedangkan untuk derivatif kedua diplotkan dengan  $d^2A/d\lambda^2$  dan seterusnya (Lilie, 2007).



Pada metode derivatif, terdapat empat metode umum yang dapat digunakan untuk evaluasi spektra pada spektrofotometri derivatif, di antaranya adalah metode *peak to peak*, *peak-tangent*, *peak-zero* (*zero crossing*) dan metode *peak-peak ratio* (rasio spektra).

Validasi metode adalah untuk menjamin bahwa metode analisis bersifat akurat, spesifik, reproduisibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Validasi dapat diartikan tindakan untuk konfirmasi bahwa metode analisis yang akan digunakan sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Tujuan utama validasi metode adalah untuk menghasilkan hasil analisis yang paling baik. Untuk mencapai hasil yang diinginkan maka semua variabel yang terkait dengan metode analisis harus divalidasi. Hal tersebut di antaranya adalah prosedur pengambilan sampel, persiapan sampel, jenis pelarut yang digunakan dan lain-lain. Parameter-parameter dalam validasi terbagi menjadi presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesifisitas, linearitas dan rentang, kekasaran (*ruggedness*), ketahanan (*robustness*) (Abdul, 2009).

Presisi adalah parameter yang menyatakan tingkat kesesuaian (ketelitian) antara hasil pengujian sampel yang dilakukan berulang kali dari sampel yang sama pada kondisi tertentu. Presisi diukur dengan menggunakan perhitungan standar deviasi untuk menyatakan koefisien variasi (CV) atau % standar deviasi (Ermer, 2015.):

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

Simpangan baku relatif (RSD) dapat dihitung dengan rumus:

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

Batas yang diterima pada presisi seperti pada Tabel 1 (Ermer, 2015)

Gambar 1. Plot Spektrum Normal dan Derivatif

Tabel 1. Rentang Maksimum yang Diperbolehkan pada Presisi

Concentration of analyte (%)	Concentration of analyte (ppm)	Concentration with w/w units	Concentration fraction	Horwitz-Thompson reproducibility value (%RSD)
100	-	1.000 g g <sup>-1</sup>	1	2
1	10.000 ppm	10 mg g <sup>-1</sup>	0.01	4



0.1	1.000 ppm	1 mg g <sup>-1</sup>	0.001	5.7
0.05	500 ppm	500 µg g <sup>-1</sup>	0.0005	6
0.01	100 ppm	100 µg g <sup>-1</sup>	0.0001	8
0.001	10 ppm	10 µg g <sup>-1</sup>	0.00001	11
0.0001	1 ppm	1 µg g <sup>-1</sup>	0.000001	16
0.00001	100 ppb	0.1 µg g <sup>-1</sup>	0.0000001	22
<0.00001	<100 ppb	<0.1 µg g <sup>-1</sup>	<0.0000001	22

Akurasi merupakan suatu parameter metode analisis untuk melihat ukuran dari bias dari sebuah kesalahan sistematis dalam sebuah analisis. Terdapat 2 cara untuk melakukan pengujian akurasi, pertama melakukan perbandingan hasil dari prosedur yang divalidasi dengan hasil dari prosedur tervalidasi ortogonal. Cara kedua adalah dengan membandingkan hasil dari suatu prosedur relatif terhadap bahan standar primer. Nilai akurasi dilambangkan dengan % perolehan kembali (recovery). Untuk melakukan uji akurasi diperlukan minimal 6 kali pengujian (Ermer, 2015). Menurut (Harmita, 2004) akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analit dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali analit yang ditambahkan. Uji akurasi dilakukan untuk melihat ketelitian alat dan analisisnya dalam membuat konsentrasi larutan yang sesuai dengan kadar yang sebenarnya. Pada akurasi terdapat dua metode yang dapat digunakan yaitu:

- a. Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*)  
 Pada metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia CRM atau SRM) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) kemudian cairan tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (Harmita, 2004).
- b. Metode adisi  
 Pada metode adisi, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis ulang. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (Harmita, 2004).

Pada akurasi juga harus dinyatakan dengan % Recovery

$$\% Recovery = \frac{\text{kadar sesungguhnya}}{\text{kadar teoritis}} \times 100\%$$

Batas yang diterima pada Akurasi seperti pada Tabel 2 (Huber, 2007)

**Tabel 2. Rentang Maksimum yang Diperbolehkan pada Akurasi**

Active Ingredient (%)	Analyte ratio	Unit	Mean recovery (%)
100	1	100%	98-102
≥10	10 <sup>-1</sup>	10%	98-102
≥1	10 <sup>-2</sup>	1%	97-103
≥0.1	10 <sup>-3</sup>	0.10%	95-105
0.01	10 <sup>-4</sup>	100 ppm	90-107
0.001	10 <sup>-5</sup>	10 ppm	80-110
0.0001	10 <sup>-6</sup>	1 ppm	80-110
0.00001	10 <sup>-7</sup>	100 ppb	80-110
0.000001	10 <sup>-8</sup>	10 ppb	60-115



Batas deteksi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Batas deteksi merupakan parameter untuk uji batas. Batas deteksi didasarkan pada penggunaan. Apabila pada analisis yang tidak menggunakan batas deteksi ditentukan dengan mendeteksi analit di dalam sampel pada pengenceran bertingkat. Pada analisis yang menggunakan batas deteksi dihitung dengan cara mengukur respon blangko beberapa kali lalu dihitung dengan simpangan baku respon blangko dan formula. Perhitungan batas deteksi (LOD) dapat dihitung dengan rumus:

$$Q = \frac{3Sy/x}{S_1}$$

Batas kuantifikasi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Batas kuantifikasi merupakan hubungan antara konsentrasi dengan presisi dan akurasi yang dipersyaratkan. Jika konsentrasi LOQ menurun maka presisi juga menurun. Jika syarat untuk presisi tinggi, maka konsentrasi LOQ harus lebih tinggi. (Rohman, 2009). Batas kuantifikasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi (Harmita, 2004). Perhitungan batas kuantifikasi (LOQ) dapat dihitung dengan rumus:

$$Q = \frac{10Sy/x}{S_1}$$

Spesifitas merupakan suatu metode yang kemampuannya hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin terdapat dalam matriks sampel. Komponen lain yang terdapat dalam matriks sampel yaitu adanya pengganggu, prekursor, sintetik, produk degradasi, dan komponen matriks. Penentuan spesifitas metode dapat diperoleh dengan dua cara yaitu melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain dan juga dapat menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama (Rohman, 2009).

Linieritas adalah salah satu metode analisis yang dapat menunjukkan bahwa area analit dalam larutan sampel berada dalam rentang konsentrasi analit dalam larutan sampel berada pada rentang tertentu linieritas dinyatakan dalam istilah variasi disekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan absorbansi yang diperoleh dari hasil analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Linieritas merupakan suatu parameter metode analisis untuk menyatakan suatu metode mampu memberikan hasil yang linear pada konsentrasi apa pun. Untuk mendapatkan nilai dari linearitas dapat menggunakan eriva analisis kurva kalibrasi. Nilai linearitas dilambangkan dengan huruf R. Linearitas dilakukan di awal penelitian sebagai dasar untuk pembuatan kurva kalibrasi. Untuk menguji linearitas setidaknya

diperlukan 5 konsentrasi berbeda. Kriteria yang baik untuk nilai linearitas adalah  $\geq 0.999$  (Ermer, 2015).

Linearitas juga merupakan suatu metode yang merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara konsentrasi (x) dengan respon (y). Evaluasi linearitas dapat dilakukan dengan cara metode uji kurva respon. Linearitas diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil yang kemudian menghasilkan data dengan nilai kemiringan (slope), intersep, dan koefisien korelasinya. (Abdul, 2009). Rentang metode merupakan pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dan dapat ditetapkan nilai keseksamaan, kecermatan, dan linearitas yang dapat diterima (Harmita, 2004).

## METODE PENELITIAN

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian yang bersifat eksperimental laboratorium, yaitu mengembangkan dan melakukan validasi metode spektrofotometri UV-Vis yang digunakan untuk analisis kafein dalam suplemen.

### Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer Uv-vis (*Jasco V-760*), kuvet, timbangan analitik, alat-alat gelas, aluminium foil.

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah baku pembanding kafein, suplemen kafein, metanol, etanol, asam sitrat, akuades.

### Prosedur Penelitian

#### Optimasi

#### Pemilihan Pelarut

Dilakukan pemilihan pelarut antara metanol dengan campuran asam sitrat, etanol dengan campuran asam sitrat, etanol, dan methnol. Penilaian kelarutan dilakukan secara visual, dan dipilih yang kekeruhannya paling rendah saat diaplikasikan pada sampel.

#### Pemilihan Panjang Gelombang

Larutan standar dan sampel dengan kadar 10 ppm diukur untuk mencari spektra dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm kemudian dihilangkan panjang gelombang *noise* dan diukur pada spektra derivatif.

#### Pemilihan Panjang Gelombang Derivatif

Penentuan panjang gelombang derivatif dilakukan dengan menumpang tindihkan spektrum serapan dan dilihat pada sektra normal, derivatif 1, derivatif 2, derivatif 3, dan derivatif 4.

### Validasi

#### Selektivitas

Dilakukan pembuatan larutan baku dan larutan sampel kemudian diamati spektranya dan dilakukan pengamatan *data comparism* untuk melihat nilai *match factor* yang didapatkan.



### Linearitas

Dilakukan pembuatan larutan baku induk asam retinoat 1000 ppm dengan menimbang 10 mg asam retinoat ke dalam labu 10 ml dan dilarutkan dengan metanol kemudian diencerkan menjadi 10 ppm dengan cara diambil kemudian dibuat larutan baku kerja tujuh titik yaitu 17 ppm; 19 ppm; 20 ppm; 21 ppm; 22 ppm; 23 ppm; 24 ppm. Setelah itu diamati absorbansinya pada panjang gelombang yang terpilih dan dihitung linearitasnya menggunakan program validasi *Validation Method Analysis* (VMA) dan *Microsoft Excel*.

### LOD dan LOQ

Dilakukan pembuatan larutan baku induk asam retinoat 1000 ppm dengan menimbang 10 mg asam retinoat ke dalam labu 10 ml dan dilarutkan dengan metanol kemudian diencerkan menjadi 10 ppm dengan cara diambil kemudian dibuat larutan baku kerja tujuh titik yaitu 17 ppm; 19 ppm; 20 ppm; 21 ppm; 22 ppm; 23 ppm; 24 ppm. Setelah itu diamati absorbansinya pada panjang gelombang yang terpilih dan dilihat batas deteksi dan batas kualifikasinya menggunakan program validasi *Validation Method Analysis* (VMA).

### Presisi

Pada penentuan uji presisi dilakukan dengan cara menghitung standar deviasi relatif (RSD) dilakukan dengan cara menimbang sampel kafein asam sitrat kemudian dilarutkan dengan metanol pengukuran dilakukan pada kadar 15 ppm dilakukan sebanyak 6x replikasi selama 3 hari berturut-turut setelah itu diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan dihitung nilai RSD nya..

### Akurasi

Pada uji akurasi metode dibuat sesuai dengan metode penambahan adisi yaitu dengan menghitung nilai % recovery penambahan analit sebesar 30%,45%,60% dari konsentrasi yang digunakan pada waktu presisi kemudian dipreparasi dan dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis kemudian dipreparasi dan pada masing-masing konsentrasi dilakukan replikasi sebanyak tiga kali dan dilakukan pengukuran absorbansi sehingga dapat ditentukan % recovery.

## Hasil dan Pembahasan

### Optimasi

#### Pemilihan Pelarut

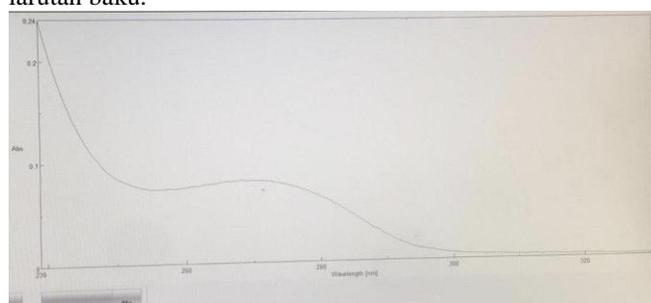
Optimasi pelarut dilakukan menggunakan standar kafein yang dilarutkan pada 4 kategori pelarut yaitu kafein yang dilarutkan dengan metanol + asam sitrat, etanol + asam sitrat, metanol, dan etanol. Kemudian yang terpilih adalah kafein dengan asam sitrat dan metanol



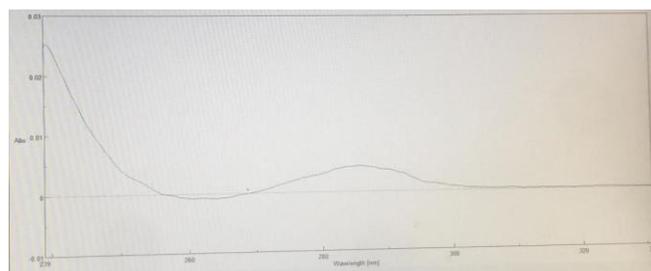
Gambar 2. Hasil Pengamatan Kelarutan Secara Visual

#### Pemilihan Panjang Gelombang Derivatif Karotenoid

Sampel dibuat menjadi dua macam yaitu larutan standar dan larutan sampel. Kemudian diamati pada panjang gelombang 200 nm-800 nm dan dihilangkan panjang gelombang *noise* nya kemudian diamati pada spektrum normal dan spektrum derivatif dan dilanjutkan dengan mengamati *match factor* kemudian dipilih yang memiliki kemiripan dengan spektra larutan baku.



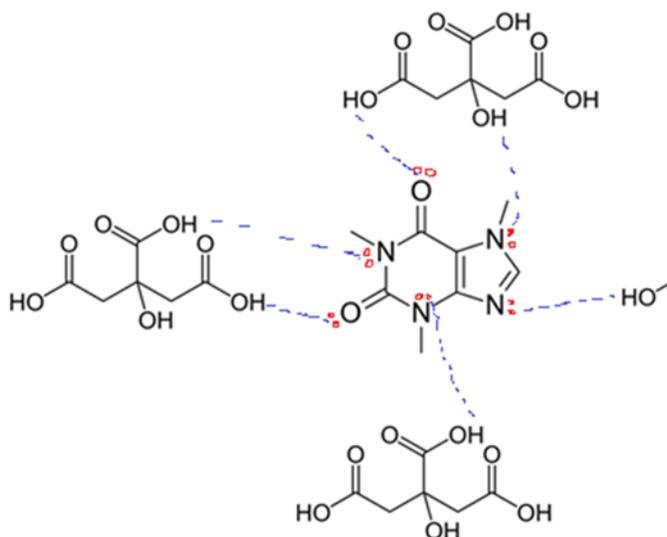
Gambar 3. Gambar Spektrum kafein Normal



Gambar 4. Gambar Spektrum kafein Derivatif 1

Selanjutnya dilakukan uji MF (*match factor*) yang bertujuan untuk mengetahui kemiripan spektrum dan bertujuan untuk memilih derivatif yang digunakan. Dapat dilihat pada gambar 4.7 ; 4.8 ; 4.9; 4.10 panjang gelombang yang dipilih adalah derivatif 1 karena derivatif memiliki nilai 1.00 dengan spektra yang *smooth*. Didalam nilai MF (*match factor*) merupakan nilai yang menunjukkan kemiripan antara larutan baku kerja kafein dengan larutan sampel suplemen kafein. Nilai MF (*match factor*) ini juga dilakukan sebagai uji selektivitas karena jika nilai *score match factor* dilihat dari *software*

spectra analysis kemudian diinsert dan data comparisme akan menghasilkan output

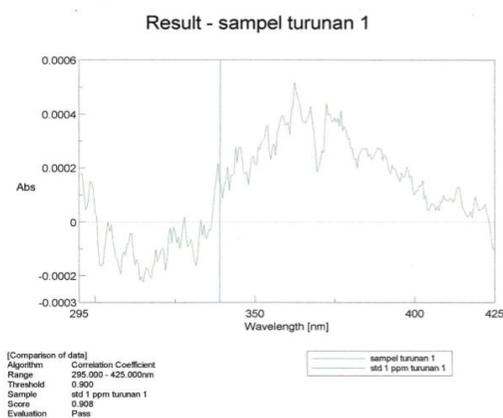


**Gambar 5. Interaksi kafein dengan asam sitrat**

Ketika kafein dilarutkan dalam asam sitrat maka akan terjadi berbagai interaksi dipol-dipol karena kedua molekul ini bersifat polar selain itu interaksi yang hydrogen (*hydrogen bond*) antara atom H (dari OH) yang berasal dari asam sitrat dengan pasangan elektron bebas (PEB) dari atom O dan N pada kafein. Sehingga mengakibatkan terbentuknya interaksi dipol-dipol dan ikatan hidrogen maka kafein akan larut dalam asam sitrat dan terjadi pergeseran hipsokromik karena jumlah asam sitrat yang ditambahkan sebagai pelarut lebih banyak daripada kafein sebagai zat terlarut, maka panjang gelombang maksimum akan tertarik ke panjang gelombang asam sitrat dimana panjang gelombang asam sitrat lebih rendah dibandingkan kafein maka hal tersebut dikatakan terjadi pergeseran hipsokromik dan diamati pada puncak *peak* (absorbansi) antara kafein yang dilarutkan dengan metanol dan ketiga senyawa ini bersifat polar pada pergeseran hipsokromik juga dialami oleh zat yang bersifat polar juga (Suhartati, 2017). Jika terjadi peningkatan *peak* maka terjadi efek hiperkromik dan jika terjadi penurunan *peak* maka terjadi hipsokromik. Dapat disimpulkan terjadi degradasi pada struktur kafein akibat penambahan asam sitrat karena adanya pergeseran panjang gelombang secara hipsokromik dan penurunan absorbansi (Samson *et al.*, 2013).

### Validasi Selektivitas

Selektivitas merupakan metode yang digunakan untuk mengukur kadar analit secara seksama dan cermat di dalam suatu sampel yang mengandung komponen lain yang dilakukan dengan cara membandingkan larutan baku dengan larutan sampel untuk mengetahui apakah di dalam sampel tersebut memiliki kandungan yang sama seperti pada larutan baku. Selektivitas adalah parameter validasi metode yang digunakan untuk mengukur kadar analit secara seksama didalam suatu sampel yang mengandung komponen lain. Larutan yang digunakan adalah larutan standar kafein dan larutan sampel. Dari hasil selektivitas memiliki match factor sebesar 1.00 yang artinya memiliki kemiripan yang tinggi terhadap spektrum kafein



**Gambar 6. Hasil Pengujian Match Factor Spektrum Retinoic Acid Derivatif 1**

### Linearitas

Dilakukan pembuatan kurva baku ditimbang 10 mg kafein dan asam sitrat 100 mg kemudian dilarutkan 10 ml etanol sehingga menjadi 1000 ppm dapat dilihat pada lampiran A. Kemudian dibuat larutan baku kerja dengan cara mengambil larutan baku 0,17 ml; 0,19 ml; 0,2 ml; 0,21 ml ; 0,22 ml; 0,23 ml; 0,24 ml dimasukkan masing-masing ke dalam labu 10 ml lalu ditambahkan pelarut sampai tanda batas sehingga memperoleh konsentrasi 17 ppm, 19 ppm, 20 ppm, 21 ppm, 22 ppm, 23 ppm, 24 ppm. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran B. Kemudian diamati pada panjang gelombang 239-331 nm pada derivatif pertama, pada panjang gelombang 239 menunjukkan hasil yang linier. pada derivative pertama pada Panjang gelombang 331. Hasil anova uji statistik ANOVA (analysis of variance) dilakukan untuk menguji hipotesis dan homogenitas varians intra serial, serta mengidentifikasi adanya perbedaan rata-rata antar kelompok (dapat digunakan untuk menguji lebih dari 2 kelompok). Hasil yang didapatkan pada linieritas uji anova ini adalah  $5,46 \times 10^{-5}$  dapat dilihat pada lampiran E. Hal ini memenuhi persyaratan karena pada persyaratan anova

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	4,53E-05	4,53E-05	328,1309	5,46E-05
Residual	4	5,52E-07	1,38E-07		
Total	5	4,58E-05			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 99.0%	Upper 99.0%
Intercept	0,002741	0,00132	2,07669	0,106421	-0,00092	0,006406	-0,00334	0,008818201
konsentrasi	0,00114	6,29E-05	18,11438	5,46E-05	0,000965	0,001315	0,00085	0,001429841

	Hari	RSD
	1	6,176
	2	3,624
	3	1,449
	Rata-rata	3,750

Tabel 3. Pengujian Anova 17-24 ppm

**LOD dan LOQ**

LOD dan LOQ dilakukan untuk mengetahui batas konsentrasi analit yang dideteksi dan untuk mengetahui batas konsentrasi analit yang didapat yang terkuantifikasi oleh alat. Untuk mengetahui batas deteksi dan batas kuantitas dilakukan pembuatan larutan dengan 6 konsentrasi yang berbeda yaitu 17 ppm, 19 ppm, 20 ppm, 22 ppm, 23ppm, 24ppm. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang derivatif pertama kemudian dilihat hubungan linier antara konsentrasi dan absorbansi dan dilanjutkan pengukuran batas deteksi dan batas kuantitas menggunakan program *Validation Method Analysis* (VMA) Hasil dari analisis menggunakan *Validation Method Analysis* (VMA) didapatkan parameter: Batas Deteksi : 4,5 ppm, Batas Kuantifikasi : 13,6ppm..

**Presisi**

Presisi merupakan parameter yang menyatakan tingkat kesesuaian (ketelitian) antara hasil pengujian sampel yang dilakukan berulang kali dari sampel yang sama pada kondisi tertentu. Presisi diukur dengan menggunakan perhitungan standar deviasi untuk menyatakan koefisien variasi (CV) atau % standar deviasi relatif. Pada penelitian ini digunakan metode adisi dengan menguji menggunakan enam kali replikasi tiga hari berturut-turut dilakukan konsentrasi 15 ppm kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis sehingga didapatkan nilai absorbansi sampel yang terukur kemudian dihitung nilai RSD sehingga didapatkan nilai absorbansi sampel yang diukur dan kemudian dihitung RSD (standar deviasi relatif) dan memberikan hasil seperti pada tabel 5. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian presisi memenuhi syarat karena karena kurang dari 8%.

Tabel 5. Data Presisi

Selain itu, untuk mendukung data presisi maka digunakan

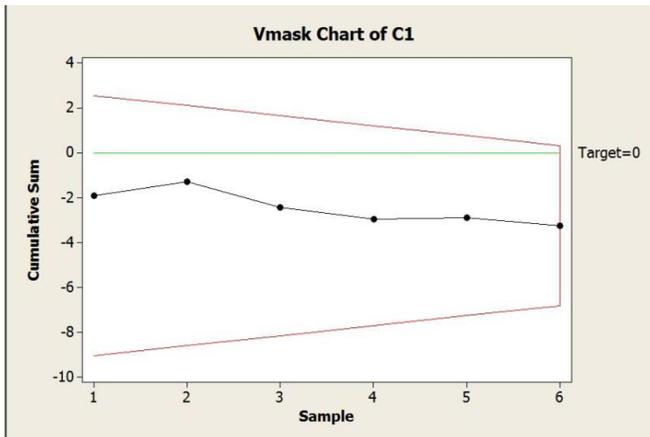
perhitungan interval kepercayaan 99% dengan menghitung t hitung. T hitung tidak boleh melebihi t tabel yaitu 4,0321. Perhitungan t tabel ditunjukkan pada tabel 6.

Tabel 6. Perhitungan t hitung dengan CI 99%

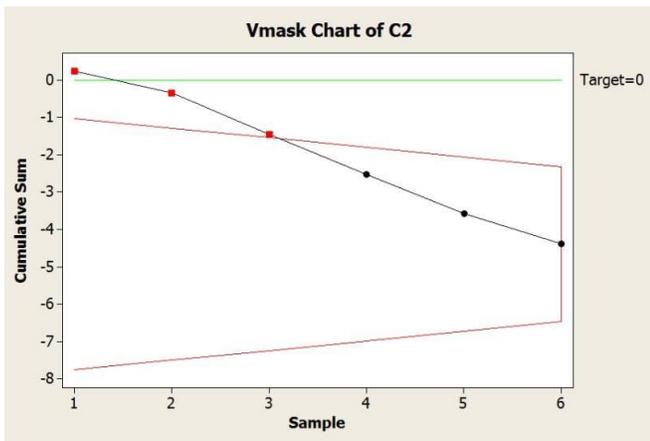
Replikasi	Hari 1	hari 2	hari 3
1	-3,729	4,000	3,716
2	3,209	0,721	1,958
3	-1,681	-1,857	-2,287
4	0,021	-1,586	-0,044
5	1,634	-1,481	-2,546
6	0,545	-0,395	-0,797

Seperti pada tabel 6 bahwa t hitung tidak melebihi t tabel yang artinya memenuhi persyaratan presisi. Selain itu juga dilakukan pengujian Cusum seperti pada gambar 7, gambar 8, dan gambar 9.

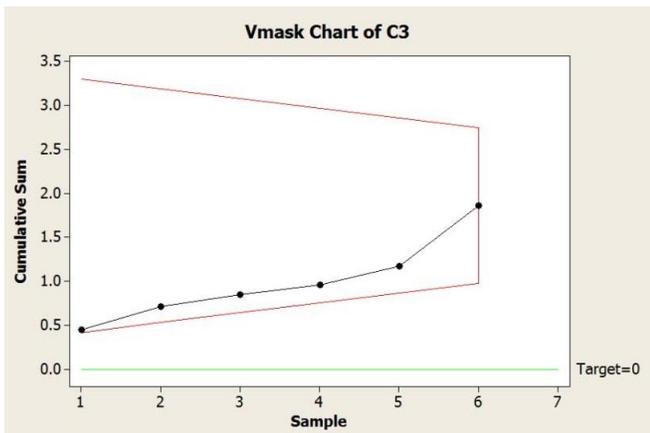




Gambar 7. Pengujian Cusum pada Presisi Hari ke-1



Gambar 8. Pengujian Cusum pada Presisi Hari ke-2



Gambar 9. Pengujian Cusum pada Presisi Hari ke-3

Pengujian CUSUM (Cumulative Sum) digunakan untuk mengetahui atau mendeteksi pergeseran pada mean atau varians dalam proses yang disebabkan oleh adanya penyebab khusus (Ermer, 2015). Penelitian ini dibuat dengan diagram CUSUM dibuat dengan software minitab dengan menggunakan desain V-mask pada pengujian cusum atau seperti pada gambar 4.13; 4.14; 4.15 sampel berada pada batas yang ditentukan atau pada in control yang artinya pergeseran pada kadar dalam presisi ini masih berada didalam batas kecuali satu sampel pada gambar 4.14 akan tetapi masih

dapat diterima karena masih memenuhi syarat untuk nilai RSD dan perhitungan t hitung beberapa sampel uji dan mean dan standar deviasi (atau rentang ulangan) dari kontrol dan blanko diplot secara terpisah. Proses analisis "terkendali" jika tidak lebih dari 5% dari nilainya jatuh di zona peringatan. Nilai apa pun yang jatuh di atas batas penolakan atau dua nilai berturut-turut di wilayah peringatan memerlukan investigasi dan tindakan korektif (AOAC, 2019).

**Akurasi**

Akurasi merupakan suatu parameter metode analisis untuk melihat ukuran dari bias dari sebuah kesalahan sistematis dalam sebuah analisis. Terdapat 2 cara untuk melakukan pengujian akurasi, pertama melakukan perbandingan hasil dari prosedur yang divalidasi dengan hasil dari prosedur tervalidasi ortogonal. Cara kedua adalah dengan membandingkan hasil dari suatu prosedur relatif terhadap bahan standar primer. Nilai akurasi dilambangkan dengan % perolehan kembali (recovery). Pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode adisi yang merupakan metode penambahan sampel suplemen kafein sebesar 30%, 45%, 60% dari konsentrasi 15 ppm. Berdasarkan hasil pengujian akurasi dengan metode adisi ditunjukkan pada tabel 4.6 didapatkan hasil 97,4% yang artinya memenuhi persyaratan karena jumlah analit lebih dari 10 ppm pada persyaratan akurasi adalah 90%-hingga 107% (Ludwig, 2007).

**Tabel 7. Data Akurasi**

Adisi	Konse	Konsentrasi	%R	rata-rata	Sd	RSD
	ntrasi	sesungguhn	ecov			
		ya	ery			
30%	19,5	17,622	90,3			
			70	91,123	0,731	0,802
	19,5	17,777	91,1			
45%	19,5	17,907	91,8			
			30			
	21,75	21,698	99,7			
			64		2,763	2,686
60%	21,75	22,839	105,	102,890		
			009			
	2175	22,597	103,			
			898			
Rata-rata	24	23,648	98,5			
			337		1,085	1,103
	24	23,313	97,1	98,315		
			375			
		24	23,826	99,2		
			75			
Rata-rata					97,443	

**Penetapan Kadar**



Pada tahap terakhir yang dilakukan yaitu penetapan kadar pada empat sampel yang berbeda. Penetapan kadar dilakukan setelah metode-metode yang dilakukan tervalidasi. Penetapan kadar kafein dalam suplemen dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan metode kurva derivatif dapat dilihat data absorbansi pada lampiran H. Dari hasil pengujian terhadap empat sampel tersebut didapatkan hasil yang berbeda juga pada sampel minuman berenergi

**Tabel 8. Hasil Penetapan Kadar**

Sampel	(%) Kadar
A	20,968
B	21,300
C	40,903
D	24,981

### Kesimpulan dan Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan Pada kondisi analisis yang optimal suplemen kafein menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan metode derivatif yaitu diamati pada Panjang gelombang 239 nm dengan menggunakan pelarut metanol dan campuran asam sitrat. Metode spektrofotometri UV-Vis dengan metode derivatif memberikan hasil yaitu 0,988, linier dengan koefisien relasi ( r ) 0,976 dan p-value  $5,46 \times 10^{-5}$  dengan batas deteksi 4,5 ppm dan batas kuantifikasi 13,6ppm, dengan penyimpangan 3,750% dan akurat dengan hasil perolehan kembali 97,443%. Dalam analisis kafein dalam suplemen yang menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis dapat diterapkan pada suplemen yang beredar di pasaran..

Saran dari penelitian ini yaitu diharapkan pada penelitian selanjutnya Perlunya dilakukan validasi metode dengan parameter yang lebih luas seperti kekuatan (robustness) dan ketangguhan (ruggedness). Perlu melakukan pengembangan dengan preparasi yang lebih baik.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad Bhawani, S., Fong, S. S., & Mohamad Ibrahim, M. N. 2015. Spectrophotometric Analysis of Caffeine. *International Journal of Analytical Chemistry*.
- Ade Heri Mulyati, Sutanto, D. A. 2011. Validasi Metode Analisis Kadar Ambroksol Hidroklorida dalam Sediaan Tablet Cystelis® secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Ekologia*. 11(2): 36–45
- Anderson, I. B., & Kearney, T. E. 1991. Poisoning & Drug Overdose. In *Annals of Internal Medicine* Vol. 114 Issue 1. California Poison Control System. California AOAC International. 2012. Guideline for Dietary Supplements and Botanical (Appendix K). AOAC Official Method Analysis. 8,9,11.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2005. Artikel Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan.
- Day, R.A and Underwood, A.L (ed). 2002. Analisis Kimia Kuantitatif. Erlangga. Jakarta.
- DepKes, R. 2014. Farmakope Indonesia (5Th Ed). Jakarta.
- Desiplia, R., Indra, E. N., & Puspaningtyas, D. E. 2018. Asupan Energi, Konsumsi Suplemen dan Tingkat Kebugaran pada Atlet Sepak Bola Semi-Profesional. *Ilmu Gizi Indonesia*, 2(1): 39.
- Ermer, J. 2015. Method Validation in Pharmaceutical Analysis, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi. 3 (1) : 117-135
- Hermawati, Y., Rofieq, A., & Wahyono, P. 2015. Pengaruh Konsentrasi Asam Sitrat Terhadap Karakteristik Ekstrak Antosianin Daun Jati Serta Uji Stabilitasnya dalam Es Krim. *Seminar Nasional Pendidikan Biologi FKIP Universitas Muhammadiyah*, 4 : 301–308.
- Helwandi, I. 2016. Validasi Metode Spektrofotometri UV-Vis Analisis Tiga Panjang Gelombang Untuk Penetapan Kadar Tablet Prednison Yang Mengandung Zat Pewarna. *Skripsi*, 101.
- Hidayah, T. 2013. Studi Kasus Konsumsi Suplemen pada Member Fitness Center di Kota Yogyakarta. *Media Ilmu Keolahragaan Indonesia*, 3(1).
- Chess Praxis.2010. A Supplement to the Chess Player's. Howard Staunton
- Huber, L. 2007. Validation and Qualification In Analytical Laboratories, 2nd edition. Informa Healthcare. USA
- Krukowski, S., Karasiewicz, M., & Kolodziejcki, W. 2017. Convenient UV-Spectrophotometric Determination Of Citrates In Aqueous Solutions With Applications In The Pharmaceutical Analysis Of Oral Electrolyte Formulations. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3): 717–722.
- Lilie, N. 2007. Spektrofotometri Derivatif dan Aplikasinya dalam Bidang Farmasi. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 5(2):1-9.
- Bada pengawas obat dan makanan . 2016. Artikel Hal-Hal yang Perlu Diwaspadai untuk Menghindari Keracunan Kafein dalam Minuman.
- Rollando, R., Duhu, A. E., & Sitepu, R. 2020. Perbandingan Validasi Metode Kompleksimetri dan Spektrometri Uv-Vis Derivatif Tablet Kalsium. *Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pembelajarannya (SNKP)*
- Rosita, N. 2015. Uji Validasi Metode Zero Crossing Spektrofotometri Derivatif Pada Penetapan Kadar Kafein Dan Paracetamol dalam Sediaan Tablet. *Skripsi*. S.Farm. Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Thomas, O., & Burgess, C. 2017. UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater. Elsevier. UK.
- Valavanidis, A. 2016. Dietary Supplements : Beneficial to Human Health of Just Peace of Mind? A Critical Review on the Issue of Benefit / Risk of Dietary Supplements. *Pharmakeftiki*, 28(2): 69-92.
- Warono, D., & Syamsudin. 2013. Unjuk Kerja



Spektrofotometer Untuk Analisa Zat Aktif Ketoprofen.  
Konversi, 2(2): 57–65.

Watson, Joe K gerald. 2011. Nutrition and Health Dietary  
Suplemen and Nutraceuticals. Human Press.UK

Zackiyah. 2016. Spektrometri Ultra Violet/Sinar Tampak  
(UV-Vis). Kimia Analitik Instrumen, 1 : 46.

