

## **BAB II**

### **LANDASAN TEORI**

#### **A. Tinjauan Pustaka**

##### **1. VCO (Virgin Coconut Oil)**

VCO (*Virgin Coconut Oil*) atau minyak kelapa murni merupakan produk olahan yang berasal dari daging kelapa segar untuk mendapatkannya dengan cara diolah pada suhu rendah atau tidak menggunakan pemanasan, sehingga kandungan senyawa bermanfaat dalam minyak dapat dipertahankan (Tanasale, 2013). VCO diperoleh dengan mengekstraksi intikelapa segar menggunakan cara alami dan tidak tidak menjalani perawatan kimia apa pun seperti pemurnian, pemutihan, dan penghilang bau untuk menghasilkan minyak yang dimurnikan-diputihkan-deodorisasi (RBD) (Rohman et al., 2021).

Menurut USDA (*United State Deprtement Of Agriculture*) Komposisi utama dalam minyak kelapa adalah asam lemak jenuh yaitu sekitar 94%, dengan sekitar 62% lemak sedang asam. Minyak kelapa mengandung trigliserida terutama jenuh, dengan asam rantai menengah yang laurat dan miristat mendominasi. Sampel 100 g minyak kelapa, terdapat 41,84 g C12 (laurat) asam lemak jenuh, 16,65 g C14 (miristik) jenuh asam lemak, 8,64 g C16 asam lemak jenuh (palmit), 6,80 g C8 (kaprilat) asam lemak jenuh dan 2,52 g C18 (stearat) asam lemak jenuh. Nilai gizi minyak kelapa mengandung 892 kkal energi per 100 g, setara

dengan 3730 kJ per 100 g. Jumlah 99,06 g lemak ditemukan dalam sampel 100 g kelapa minyak. Minyak kelapa juga mengandung 1 mg kalsium, 0,05mg besi, 0,02 mg seng dan 0,3 mg kolin. Dalam sampel 100 gram, 0,11 mg vitamin E ditemukan (Ng et al., 2021).

Minyak trigliserida dibuat terutama dari C8 (kaprilat) dan C10 asam lemak (kaprat) yang kedua asam tersebut diklasifikasikan sebagai asam lemak rantai menengah, sedangkan asam lemak utama dalam minyak kelapa, asam laurat (C12), dapat diklasifikasikan sebagai asam lemak rantai menengah atau rantai panjang asam lemak. Dalam hal pencernaan, asam laurat berperilaku lebih seperti asam lemak rantai panjang karena mayoritas (70-75%) itu diserap dengan kilomikron dibandingkan dengan 95% asam lemak rantai menengah diserap langsung ke dalam vena portal. Asam lemak rantai sedang adalah elektrolit lemah dan sangat terionisasi pada pH netral yang meningkatkan kelarutan mereka. Ini menandai perbedaan kelarutan yang terjadi pada panjang rantai C:10 dan kurang, yang tidak termasuk asam laurat (Eyles et al., 2016).

Vitamin E adalah antioksidan dan membantu menjaga sistem kekebalan tubuh tetap kuat (Ng et al., 2021). Kandungan salah satu senyawa antioksidan dalam VCO, yaitu  $\alpha$  - tokoferol sebesar 0,5 mg /100 g minyak kelapa murni. Senyawa  $\alpha$  - tokoferol juga sering dikenal sebagai vitamin E. Vitamin E dapat mengurangi tekanan oksidatif, yaitu suatu keadaan saat tingkat oksigen reaktif intermediat (*reactive oxygen intermediate*, ROI) melebihi pertahanan antioksidan endogen yang

diakibatkan oleh paparan sinar UV (Hasibuan et al., 2018).

Minyak kelapa murni atau *virgin coconut oil* (VCO) adalah cairan tidak berwarna pada suhu di atas 30°C. Pada suhu 25 °C minyak kelapa murni menjadi padat berwarna putih. Minyak kelapa murni mencapai titik asapnya pada 232 °C, memiliki bau khas kelapa murni, dikelantang atau dihilangkan baunya. Minyak kelapa murni akan membentuk campuran homogen putih ketika dicampur dengan air dan diaduk., tidak larut dalam air, memiliki kerapatan 924,27 kg/m<sup>3</sup> (Ng et al., 2021).

Pemanfaatan VCO dalam dunia industri farmasi, makanan, dan kosmetika sebagai bahan baku produk juga telah banyak dikembangkan. VCO mempunyai kemampuan menurunkan stres oksidatif beberapa hewan coba tikus yang telah direnangkan dengan dosis 10 ml/kg berat badan, karena kandungan antioksidan yang dimilikinya. Pada penelitian ini juga menunjukkan setelah pemberian VCO pada hewan coba tikus dapat menurunkan kadar kolesterol, trigliserid, glukosa dan kortikosteron (Yeap et al., 2015). VCO yang terhidrolisis memiliki kemampuan sebagai antibakteri (Silalahi et al., 2014), hepatoprotektif (Zakaria et al., 2011), dan sebagai pencegah pro-oksidan yang dapat memediasi kematian sel (Illam et al., 2017).

VCO berpotensi sebagai pencegahan risiko terjadinya gangguan kardiovaskuler pada hewan coba tikus, dengan cara mengisolasi senyawa polifenol pada VCO, penelitian tersebut, telah dilakukan. Kandungan polifenol dari VCO yaitu sebanyak 61,22 (± 2,34) mgGAE/100g dapat

menurunkan stress oksidatif dan peradangan saraf (neuro-inflammation) pada tikus yang diinduksi methotreate (MTC) (Famurewa *et al.*, 2018).

Beberapa efek farmakologis telah dilaporkan dalam VCO yang meliputi antioksidan, anti-inflamasi, anti-hiperlipidemia dan aktivitas (Narayanankutty *et al.*, 2018). VCO disiapkan oleh teknik dingin dan fermentasi dipelajari secara ekstensif karena senyawa aktifnya seperti fenolat dan tokoferol yang terkandung. Peneliti yang berbeda juga mempelajari efek farmakologis VCO dibuat dari metode ekstraksi yang berbeda (Rohman *et al.*, 2021)

## **2. Metode Pengolahan VCO**

Pengolahan VCO diperoleh dari daging buah kelapa tua varietas dalam (berumur 11-12 bulan). Daging buah kelapa kemudian dilakukan pembersihan dan pamarutan dengan mesin pamarut kelapa untuk mendapatkan santan kental, hasil parutan dilakukan pemerasan langsung menggunakan kain saring tanpa penambahan air (Ahmad *et al.*, 2013). Krim yang diperoleh dipisahkan dari air, kemudian dipanaskan sampai terbentuk minyak dan blondo. Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan beberapa metode pengolahan VCO.

Beberapaa metode dalam pengolahan VCO tersebut adalah metode fermentasi, pemanasan bertahap, sentrifugasi, pengasaman dan pancingan.

a. Metode Ekstraksi Dingin

Proses ekstraksi dingin merupakan proses pembuatan VCO dengan mengestraksi minyak kelapa dari santan tanpa menggunakan segala pemanasan untuk melakukan proses pemecahan emulsi (Agarwal, 2017). Daging buah yang digunakan, daging buah yang tua yang dipilih dikarenakan memiliki kandungan minyak di dalamnya buah akan meningkat saat buah matang dibanding daging buah kelapa yang muda (Ng *et al.*, 2021). Manfaat dari proses ini termasuk mengurangi biaya produksi karena tidak membutuhkan pelarut dan proses pemurnian, seperti penghilang bau dan pemutihan. Hal ini juga mengakibatkan penurunan jumlah energi yang dibutuhkan sehingga membuat proses ini lebih banyak ramah lingkungan. Selanjutnya, ketika kelapa minyak disuling, fitonutrien dan polifenol di dalam minyak akan hilang. Komponen-komponen ini berkontribusi pada banyak kesehatan manfaat, seperti pencegahan kanker dan anti-inflamasi. Meskipun demikian, kekurangan dari proses ekstraksi dingin ini adalah minyak yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya (Ng *et al.*, 2021)

b. Ekstraksi menggunakan Pemanasan

Proses ekstraksi panas adalah ekstraksi yang menggunakan pemanasan . Kerugian dari proses pemanasan ini akan mengurangi antioksidan sifat minyak kelapa yang dihasilkan (Ng *et al.*, 2021). Proses ekstraksi panas adalah proses menggunakan pemanasan untuk

memisahkan emulsi antara molekul air dengan minyak. Protein berfungsi sebagai penstabil emulsi, dalam proses pemanasan mempunyai tujuan sebagai menghilangkan kesetabilan emulsi dengan mendenaturasi protein (Agarwal, 2017). Menurut penelitian bahwa VCO yang diekstraksi dingin dan VCO yang diekstraksi panas dapat disimpan selama 12 bulan dengan persentase asam lemak tetap konstan (Ng *et al.*, 2021).

c. Sentrifugasi

Teknik ekstraksi menggunakan tekanan rendah merupakan teknik yang menggunakan bahan buah kelapa yang segar dan kering. Proses ini menggunakan prinsip ekstraksi minyak dengan tekanan rendah sekitar 460 psi dengan kadar air kurang lebih 10-13%. Hasil minyak kelapa murni dengan 92,54% diperoleh ketika waktu sentrifugasi diatur hingga 60 menit dan kecepatan sentrifugasi diatur ke 2700 rpm (Silva *et al.*, 2009). Keuntungan dari metode ini termasuk produk sampingan dari proses ini, seperti batok kelapa dan sekam mungkin digunakan sebagai bahan bakar. Juga, dengan mengubah jenis pengering yang digunakan, produsen dapat memutuskan apakah akan menggunakan proses berkelanjutan, yang merupakan proses yang relatif lebih cepat tetapi membutuhkan lebih banyak tenaga kerja atau menggunakan proses batch, yang relatif lebih lambat proses tetapi hanya membutuhkan lebih sedikit tenaga kerja. Kekurangan dari metode ini termasuk metode ini membutuhkan biaya modal yang lebih tinggi karena

ada lebih banyak peralatan yang dibutuhkan dalam metode ini daripada metode lain (Ng *et al.*, 2021).

d. Metode Pendinginan dan Pembekuan

Metode ini terdiri dari kombinasi beberapa metode pemisahan minyak kelapa dari santan, yaitu metode sentrifugasi dan pengepresan dingin. Keuntungan dari metode adalah tidak proses pemanasan di atas suhu 40 °C sehingga sifat antioksidan VCO tidak berkurang. Sebelum dilakukan pendinginan dan pencairan, santan disentrifugasi terlebih dahulu. Proses sentrifugasi membantu menghilangkan padatan yang tidak diinginkan, yang terutama terdiri dari: karbohidrat, protein dan bahan berserat dari santan. Dalam proses tersebut, molekul-molekul minyak akan menggumpal karena kehilangan bentuk sferisnya dan akan menghasilkan pembentukan butiran minyak besar dalam berbagai ukuran (Agarwal, 2017).

e. Metode Fermentasi

a) Fermentasi Alami

Fermentasi alami adalah proses dengan biaya murah karena pada proses ini tidak menggunakan peralatan dan bahan yang mahal. Kekurangan metode ini proses yang dilakukan memakan waktu, karena proses melibatkan reaksi antara enzim dan krim. Metode ini tidak seperti metode lain yang membutuhkan peralatanyang dan perlakuan yang banyak , akan tetapi hanya dengan cara membiarkan santan akan mengendap dengan

sendirinya. Jika dibantu pemanasan hanya membutuhkan suhu yang minimum, sehingga melestarikan semua nutrisi, seperti ketika metode ekstraksi dingin digunakan. Proses fermentasi yang tidak terlalu lama dapat menghasilkan VCO yang mempunyai rasa yang seperti kelapa alaminya (Ng *et al.*, 2021).

Fermentasi induksi Produksi VCO dengan metode fermentasi yang diinduksi adalah metode pembuatan VCO dengan cara menambahkan mikroorganisme ke dalam santan untuk menginduksi pemisahan komponen minyak dan protein (Agarwal, 2017). Salah satu mikroorganisme yang digunakan untuk metode ekstraksi ini adalah *Lactobacillus plantarum* 1041 IAM (Zakaria *et al.*, 2011). Kultur bakteri mengubah pH campuran untuk memecahkan emulsi santan. Kerugian dari metode ini termasuk pengurangan kualitas minyak dan jangka waktu yang lama digunakan untuk ini ekstraksi (1–2 hari). Minyak yang dihasilkan dari metode ini akan berwarna kuning dan akan ada yang terfermentasi bau. Bau ini akan menutupi aroma alami kelapa dan disebabkan oleh mikroorganisme yang tidak diinginkan (Agarwal, 2017).

b) Metode Ekstraksi Enzimatis

Proses ekstraksi enzimatis adalah proses pembuatan VCO dengan mengekstraksi santan menggunakan campuran enzim ke dalamnya. Pertama mencampurkan selulosa, *temramyl*



(*endoamylase*), *viscozyme L*, *neutralse* dan *alcalase (protease)* kedalam santan. Metode ini dapat mengekstraksi kelapa yang berkualitas baik dengan hasil VCO 83%. Selanjutnya menggunakan campuran enzim yang berbeda, yaitu *protease*, *amilase*, *selulase*, *hemiselulosa* dan *pektinase*, hasil yang diperoleh adalah 65,5%. Penelitian yang lain juga melaporkan bahwa dengan menggunakan campuran 2% *hemiselulosa*, *pektinase*, *selulase* dan *gamanase*, dapat menghasilkan VCO mencapai 84 (Ng *et al.*, 2021)

f. Metode Ekstraksi Fluidasi superkritis Carbon dioksida

Ekstraksi fluida superkritis (SFE) menggunakan karbon dioksida superkritis (SCCO<sub>2</sub>) adalah metode ekstraksi alternatif yang memiliki potensi yang baik dibandingkan dengan metode ekstraksi cair menggunakan pelarut konvensional untuk mengambil bahan bioaktif dari tanaman herba. Ekstraksi fluida superkritis (SFE) merupakan teknologi yang menarik buat industri makanan, kosmetik dan industri farmasi, sebagai alternatif untuk proses konvensional seperti ekstraksi pelarut dan destilasi uap, untuk mendapatkan minyak esensial dan oleoresin yang bebas dari residu, di samping itu, dapat dilakukan pada suhu rendah, yang diperlukan untuk meningkatkan kualitas produk thermosensitive (Sondari & Puspitasari, 2018).

Metode ini daging kelapa diparut terlebih dahulu dan dikeringkan dengan pengeringan matahari untuk mengurangi kadar air dari 50

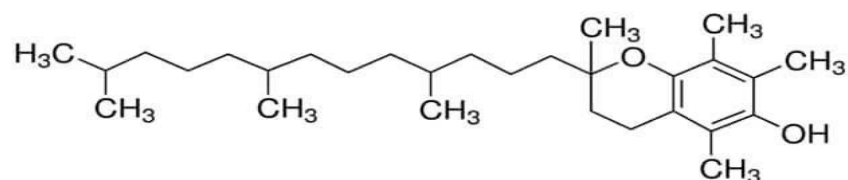
menjadi 3%. Ini untuk mencegah penyumbatan pembatas kapiler yang disebabkan oleh air beku oleh efek Joule–Thomson dalam katup ekspansi. Sampel mulai dari 0,424 hingga 1,5 mm diperoleh dengan pengayakan, proses ekstraksi yang dilakukan adalah proses semi batch dengan aliran karbon dioksida terus menerus dan laju aliran ditetapkan pada 3ml/menit. Sampel kelapa mentah telah diparut menjadi bubuk kelapa. Bubuk kelapa adalah dimasukkan ke dalam ekstraktor bersama dengan karbon dioksida. Tekanan gas akan membawa minyak keluar dari jaringan, hasil VCO ditampung dalam wadah (Che Yunus *et al.*, 2014)

g. Metode Pengepresan

Metode Pengepresan adalah cara mekanis untuk mengekstraksi minyak dari kacang-kacangan dan biji-bijian menggunakan tekanan tinggi dan panas tinggi. Metode ini umumnya menangkap sekitar 65% dari minyak dari buah. Metode ini juga dapat diterapkan pada proses pembuatan VCO (Ng *et al.*, 2021).

### 3. Alfa Tokoferol (Vitamin E)

Rumus kimia :  $C_{29}H_{50}O_2$



Gambar 1. Rumus Kimi  $\alpha$  - tokoferol

(<https://www.sigmaaldrich.com>)

**Pemerian** : Praktis tidak berbau dan tidak berasa. Bentuk  $\alpha$  - tokoferol dan  $\alpha$  - tokoferol asetat berupa minyak kental jernih, warna kuning atau kuning kehijauan. Golongan  $\alpha$  - tokoferol tidak stabil terhadap udara dan cahaya, panas dan terutama dalam suasana alkalis. Bentuk ester stabil terhadap udara dan cahaya, tetapi tidak stabil dalam suasana alkalis.

**Sinonim** : 3, 4-dihydro-2, 5, 7, 8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyl-terdecyl)-2H-1-benzopiran-6-ol; 2,5,7,8-tetramethyl-2-(4', 8', 1 $\beta$ '-trimethyldecyl) -6-chromanol;  $\alpha$ - tochoferol; 5,7,8-trimethyltolcol; vitamin anti sterilitas; Eprolin S; Epsilon; Ephynal; Syntopherol; E-vimin; Evipherol; Etavil; Phytogermine; Profecundin; Tocopharm; Viprimol; Viteolin; Esorb; Vasculals; Covitol; Evion.

**Kelarutan** : tidak larut dalam air, larut dalam etanol, dapat bercampur dengan eter, dengan aseton, dengan minyak nabati dan dengan kloroform.

**Kegunaan** : sebagai antioksidan di dalam minyak sayur dan lemak/minyak, untuk pengobatan defisiensi vitamin E, dan mencegah degenerasi otot. (Fithriyah, 2013)

Vitamin E alami mencakup empat tokoferol, masing-masing disebut tokoferol alfa, beta, gamma, dan delta. Bentuk yang digunakan

dalam tubuh manusia adalah  $\alpha$  - tokoferol , dan bentuk ini diperlukan untuk mengobati kekurangan vitamin E. Hanya bentuk ini yang diikat oleh protein transpor hati yang disebut protein transpor  $\alpha$  - tokoferol , yang membawanya ke tempat di mana ia dimasukkan ke dalam lipoprotein dan dibawa ke bagian tubuh lainnya (Thomas, 2019).

Fungsi  $\alpha$  - tokoferol adalah sebagai antioksidan yang larut dalam lemak, yang memutus rantai reaksi oksidasi yang merambat ke membran sel atau protein plasma. Semua membran sel yang mengandung lemak mudah teroksidasi oleh serangan radikal bebas melalui proses peroksidasi lipid. Rantai akan diputus oleh  $\alpha$  - tokoferol yang seribu kali lebih rentan bereaksi dengan radikal peroksil daripada asam lemak tak jenuh.  $\alpha$  - tokoferol menyebabkan inaktivasi radikal peroksil, sedangkan  $\alpha$  - tokoferol sendiri menjadi teroksidasi dan kehilangan aktivitas antioksidan. Vitamin C dapat meregenerasi aktivitas  $\alpha$  - tokoferol setelah teroksidasi (Thomas, 2019).

$\alpha$  - tokoferol ditemukan di hampir semua biji tanaman, sumber terbaik  $\alpha$  - tokoferol termasuk biji tanaman seperti almond, biji bunga matahari dan hazelnut. Minyak zaitun dan canola juga merupakan sumber yang baik, seperti tomat, alpukat, dan bayam.  $\alpha$  - tokoferol adalah bentuk utama vitamin E dalam daun semua tanaman, dan biji dikotil (Thomas, 2019).

$\alpha$  - tokoferol dosis tinggi (2000 IU/hari) dapat menyebabkan manifestasi perdarahan pada individu yang menggunakan antikoagulan

dengan mengganggu kaskade koagulasi yang diperantarai vitamin K. Ini juga dapat terjadi pada individu dengan defisiensi vitamin K, borok perdarahan, kelainan perdarahan bawaan atau riwayat stroke hemoragik sebelumnya (Thomas, 2019).

#### **4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Kromatografi cair adalah teknik pemisahan fisik yang dilakukan antara dua fase - fase padat dan fase cair. Sebuah sampel dipisahkan menjadi analit dengan mendistribusikan (melalui partisi, adsorpsi, atau interaksi lainnya) antara fase gerak (cairan yang mengalir) dan fase diam padat (sorben yang dikemas di dalam kolom). Misalnya, cairan yang mengalir dapat berupa pelarut organik seperti heksana dan fase diam dapat berupa partikel silika berpori yang dikemas ke dalam kolom. KCKT adalah bentuk modern kromatografi kolom yang menggunakan kolom partikel kecil di mana fase geraknya dipompa dengan tekanan tinggi (Dong, 2020).

Metode analisis obat yang direkomendasikan oleh Farmakope saat ini didasarkan pada teknik kromatografi (Cielecka-Piontek et al., 2013). Salahsatu metode kromatografi yaitu Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), merupakan teknik kromatografi cair yang digunakan untuk pemisahan berbagai komponen dalam campuran. KCKT juga digunakan untuk identifikasi dan kuantifikasi senyawa dalam proses pengembangan obat dan telah digunakan di seluruh dunia sejak beberapa dekade (Chawla & Ranjan, 2016).

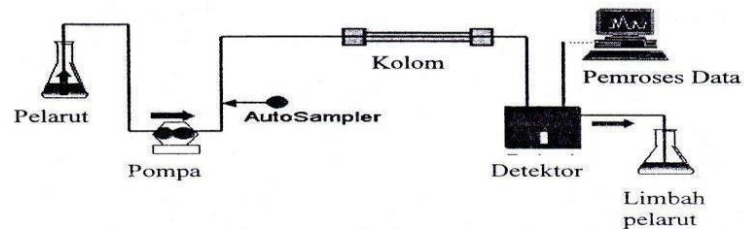
KCKT dapat dipandang sebagai pelengkap kromatografi gas (KG),

keduanya dapat digunakan untuk menghasilkan efek pemisahan yang sama baiknya. KG memerlukan proses derivatisasi pada analisisnya, sedangkan pada KCKT zat-zat yang tidak diderivatisasi masih dapat dianalisis. KCKT dapat menjadi pilihan utama untuk menganalisis zat-zat yang labil pada pemanasan atau tidak menguap. Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian (*impurities*) dan analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap (Susanti & Dachriyanus, 2017).

Peningkatan kecepatan dan efisiensi pemisahannya terkait dengan peningkatan performa kolomnya yang menggunakan kolom dengan ukuran dimensi dan partikel yang jauh lebih kecil dari kolom yang dipakai pada kromatografi kolom konvensional, sehingga agar fase gerak dapat mengalir padakolom, fase gerak dipompa dengan tekanan tinggi. Di samping itu, kinerja tingginya dalam analisis didukung dengan adanya berbagai sistem deteksi dengan kepekaan tinggi yang dapat diintegrasikan dengan sistem kromatografinya (Susanti & Dachriyanus, 2017).

Ada banyak keunggulan KCKT dibandingkan kromatografi cair kolom konvensional: 1. Kecepatan analisis (waktu analisis dapat dilakukan dalam 30 menit atau kurang) 2. Dapat menggunakan berbagai macam fase diam 3. Resolusi yang dapat ditingkatkan 4. Sensitivitas yang lebih besar dapat menggunakan berbagai macam detektor) 5. Mudah mendapatkan kembali cuplikan sampel (volume eluen lebih sedikit untuk fase gerak) (Siouffi, 2009).

Komponen penting dari KCKT dapat dilihat pada Gambar 2 , yaitu meliputi :



Gambar 2. Diagram Alat dan Komponen KCKT

(Sumber : Harmita,2006)

- a. Wadah fase gerak yaitu wadah berbahan inert (kaca) sebagai tempat fase gerak.
- b. Pompa yang berfungsi mengalirkan fase gerak melalui kolom yang terbuat dari bahan inert terhadap semua pelarut, umum digunakan gelas, baja antikorosi dan teflon. Aliran pelarut tanpa denyut sehingga dapat dihindari penyimpangan yang besar. Pompa harus menghasilkan tekanan sampai 600 psi dengan kecepatan alir berkisar 0,1-10 ml/menit.
- c. Injektor yaitu bagian yang digunakan untuk memasukkan sampel dan kemudian sampel dapat didistribusikan masuk ke dalam kolom. Sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan kantong sampel.
- d. Kolom yaitu merupakan tempat fase diam untuk berlangsungnya proses pemisahan sampel. Kolom dibagi dua yaitu

- a) Kolom analitik: memiliki diameter 2 - 6 mm dengan panjang tergantung pada jenis kemasan. Panjang kolom untuk kemasan porosmakropartikulat (37 - 44  $\mu$ ) adalah 50 - 100 cm dan untuk kemasan poros mikropartikulat (< 20  $\mu$ ) pada umumnya 10 - 30 cm.
- b) Kolom preparatif: umumnya memiliki diameter  $\geq$  6 mm dan panjang 25 - 100 cm.
- e. Detektor yaitu bagian KCKT yang berfungsi untuk mendeteksi komponen sampel dalam aliran yang keluar dari kolom. Detektor pada KCKT dikelompokkan 2 golongan, yaitu :
  - c) Detektor universal merupakan detektor yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif, seperti: detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa.
  - d) Detektor spesifik yaitu detektor yang hanya mendeteksi senyawa secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi dan elektrokimia.
- f. Integrator adalah peralatan elektronik yang sering dijumpai pada peralatan kromatografi modern. Alat ini akan mengubah tanda-tanda listrik dari detektor menjadi kromatogram sekaligus menghitung luas kromatogram yang dibentuk secara elektronik.
- g. Rekorder adalah bagian KCKT yang berfungsi menerima sinyal dari detektor dan integrator kemudian menampilkan hasil



pemisahan senyawa pada sistem kromatografi (Suprianto, 2021).

## 5. Uji Kesesuaian Sistem KCKT

Dalam pengembangan metode analisis menggunakan metode KCKT, parameter uji kesesuaian sistem merupakan hal yang penting dalam menentukan hasil analisa. Melalui uji kesesuaian sistem akan mendapatkan keyakinan tentang keefektifan sistem kromatografi sehingga data analisis yang dihasilkan cukup handal untuk dipakai dalam menyimpulkan suatu hasil pengujian yang valid dan dapat dipertanggungjawabkan.

Parameter dari uji kesesuaian sistem kromatografi pada KCKT meliputi, daya pemisahan (resolusi ( $R_s$ )), efisiensi kolom ( $N$ ), faktor kapasitas ( $k'$ ), dan faktor kesimetrisan (*tailing*) (Suprianto, 2018). Daya pemisahan atau resolusi ( $R_s$ ) didefinisikan sebagai perbedaan antara waktu retensi 2 puncak yang saling berdekatan ( $\Delta t_R = t_{R2} - t_{R1}$ ) dibagidengan rata-rata lebar puncak  $(W_1 + W_2)/2$ . Nilai  $R_s$  harus mendekati atau lebih dari 1,5 karena akan memberikan pemisahan puncak yang baik (*base line resolution*) (Suprianto, 2018).

Faktor *tailing* atau disebut juga *Tailing Factor* (TF) yaitu terjadinya pengekoran pada kromatogram sehingga bentuk kromatogram menjadi tidak simetris. Kromatogram yang memberikan nilai  $TF = 1$  berarti kromatogram yang dihasilkan simetris. Harga  $TF > 1$  berarti kromatogram tersebut mengekor (*tailing*), semakin besar harga TF (tidak lebih besar dari 2) maka makin efisien kolom yang dipakai semakin buruk. Bila harga TF

$< 1$  berarti kromatogram tersebut mengalami *fronting* (Suprianto, 2018).

Efisiensi kolom (N) didefinisikan sebagai jumlah lempeng teoritis per meter (N) yang merupakan ukuran ketajaman kromatogram. Kinerja kolom yang berubah ditunjukkan dari lebar kromatogram yang berbeda pada analisis berulang sehingga memberikan nilai efisiensi kolom yang berbeda (Suprianto, 2018)

Faktor kapasitas ( $k'$ ) adalah kemampuan senyawa tertentu berinteraksi dengan sistem kromatografi dan menentukan retensi dari senyawa terlarut. Faktor ini merupakan perbandingan waktu atau jumlah senyawa dalam fase diam dan dalam fase gerak. Jika  $k'$  kurang dari satu maka elusinya sangat cepat sehingga senyawa sedikit diretensi (ditahan) oleh kolom (Suprianto, 2018)

## 6. Analisa Dalam KCKT

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah metode modern dalam analisis farmasi untuk pemisahan suatu senyawa, yang dapat digunakan sebagai uji identitas, uji kemurnian dan penetapan kadar. KCKT mempunyai titik berat analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi, yang tidak bisa dianalisis dengan Kromatografi Gas (Susanti & Dachriyanus, 2017).

### a. Analisa Kualitatif

Sebuah kromatogram dalam KCKT dapat memberikan informasi kualitatif terhadap senyawa tertentu dalam suatu sampel. Hal tersebut dapat dilihat berdasarkan waktu retensi ( $t_R$ ) atau posisi

puncak kromatogram pada fasa diam setelah waktu elusi tertentu. Jika sampel tidak menghasilkan puncak pada waktu retensi ( $t_R$ ) yang sama dengan standar, yang dilakukan dengan prosedur atau perlakuan pada kondisi yang sama, maka dapat diasumsikan senyawa tersebut tidak ada dalam sampel atau kadar dibawah limit deteksi dari prosedur (Susanti & Dachriyanus, 2017).

#### **b. Analisa Kuantitatif**

Analisa kuantitatif dari massa solut dalam suatu sampel dapat dilakukan berdasarkan perbandingan pengukuran tinggi atau luas puncak dari solut dengan puncak standar referensi pada konsentrasi yang diketahui.

##### **1) Analisa berdasarkan Tinggi Puncak**

Tinggi puncak kromatogram diperoleh dengan menghubungkan baseline pada sisi puncak dengan garis tegak yang diukur mengenai puncak. Tinggi puncak berbanding terbalik dengan lebar puncak. Jika tinggi puncak akan digunakan untuk tujuan analitik maka seluruh parameter yang dapat mempengaruhi lebar puncak harus dipertahankan konstan. Selain itu komposisi pelarut harus dipertahankan stabil dan temperatur harus dipertahankan konstan. Kecepatan alir fasa gerak dan injeksi sampel harus dipertahankan konstan. Pengaruh injeksi sampel merupakan masalah penting dalam puncak awal dari kromatogram (Susanti & Dachriyanus, 2017).

## 2) Analisa berdasarkan Luas Area Puncak

Luas puncak merupakan integrasi dari tinggi puncak (konsentrasi) terhadap waktu (aliran volume dari fasa gerak) nilainya sebanding dengan total massa solut yang dielusi (Susanti & Dachriyanus, 2017).

## 3) Prosedur untuk Analisa Kuantitatif

### a) Metoda Standar Internal

Metoda ini digunakan standar internal yang mungkin akan memberikan hasil lebih akurat secara kuantitatif. Dengan metodastandar internal prosedur tergantung pada zat yang akan dielusi dan ditambahkan standar referensi yang mempunyai struktur kimia yang mirip tetapi tidak mempengaruhi komponen asli dari sampel sehingga kesalahan injeksi sampel dapat dicegah. Jika memungkinkan standar internal harus dipisahkan dari puncak seluruh komponen sampel ( $R_s > 1,25$ ) juga dari puncak standar.

### b) Metoda Standar Eksternal

Metoda ini membutuhkan standar eksternal yang dilakukan kromatografi secara terpisah dari sampel dengan kondisi kromatografi yang harus dipertahankan konstan. Standar eksternal yang digunakan adalah zat yang diduga sebagai komponen sampel yang akan diuji.

c) Metoda Normalisasi

Metoda normalisasi paling mudah digunakan tetapi sayang sekali paling sedikit yang cocok untuk kromatografi cair. Elusi yang sempurna dari seluruh komponen sampel dibutuhkan, seluruh luas puncak yang dielusi dihitung sesudah pengoreksian luas tersebut dengan detektor respon ke tipe senyawa yang lain, konsentrasi analit didapat dari perbandingan puncak terhadap total luas seluruh puncak (Susanti & Dachriyanus, 2017).

## 7. Parameter Validasi Metode KCKT

Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis bersifat akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Secara singkat, validasi metode diperlukan dalam suatu proses analisis untuk memastikan hasil analisis dapat dipertanggungjawabkan (Riyanto, 2014).

### a. Ketelitian (presisi)

Ketelitian (presisi) adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Presisi dapat dinyatakan sebagai *repeatability* (keterulangan) atau *reproducibility* (ketertiruan). Kriteria seksama diberikan jika

metode memberikan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV) 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis (Riyanto, 2014).

Tabel 1 Tingkat presisi berdasarkan konsentrasi analit

Jumlah Komponen Terukur dalam Sampel (X)	Tingkat presisi (Y)
$x \geq 10,00\%$	$Y \leq 2\%$
$1,00\% \leq x \leq 10,00\%$	$Y \leq 2\%$
$0,10\% \leq x \leq 1,00\%$	$Y \leq 10\%$
$x \leq 0,10\%$	$Y \leq 20\%$

(Riyanto, 2014)

Presisi dari metode uji ditentukan dengan rumus :

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

Keterangan : SD : Standar Deviasi

X : Nilai Rata-rata

n : Ulangan

RSD : *Relatif Standar Deviation*

#### b. Akurasi (*Accuracy*)

Accuracy adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Accuracy dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Accuracy dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu

metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*) (Riyanto, 2014).

a) Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*)

Prosedur dalam metode simulasi adalah, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam plasebo (semua campuran reagent yang digunakan minus analit), kemudian campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar standar yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Recovery dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (eksepien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi.

b) Metode penambahan baku (*standard addition method*)

Prosedur dalam metode adisi (penambahan baku) adalah, sejumlah sampel dianalisis kemudian sejumlah analit yang diperiksa (*pure analit/standar*) ditambahkan ke dalam sampel, kemudian dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan).

Dalam kedua metode tersebut, *recovery* dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Biasanya persyaratan untuk *recovery* adalah tidak boleh lebih dari

5%. Akurasi menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ recovery} = \frac{C(\text{sampel} + \text{spike}) - C_{\text{sampel}}}{C_{\text{spike}}} \times 100\%$$

Tabel 2 Tingkat akurasi berdasarkan konsentrasi analit

Analit pada matriks sampel	Recovery yang diterima (%)
$10 < A \leq 100$ (%)	98-102
$1 < A \leq 10$ (%)	97-103
$0,1 < A \leq 1$ (%)	95-105
$0,001 < A \leq 0,1$ (%)	90-107
$100 \text{ ppb} < A \leq 1 \text{ ppm}$	80-110
$10 \text{ ppb} < A \leq 100 \text{ ppb}$	60-115
$1 \text{ ppb} < A \leq 10 \text{ ppb}$	40-120

(Riyanto,2014 )

### c. Linearitas dan Daerah Kerja

Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang



diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit (Riyanto, 2014).

Parameter hubungan kelinieran yang digunakan yaitu koefisien korelasi ( $r$ ) dan koefisien determinasi ( $R$ ) pada analisis regresi linier  $y = bx + a$  ( $b$  adalah slope,  $a$  adalah intersep,  $x$  adalah konsentrasi analit dan  $y$  adalah respon instrumen). Koefisien determinasi adalah rasio dari variasi yang dijelaskan terhadap variasi keseluruhan. Nilai rasio ini selalu tidak negatif sehingga ditandai dengan  $R^2$  (Riyanto, 2014).

#### **d. Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantisasi (LOQ)**

Batas deteksi (LOD) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantisasi (LOQ) merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan kuantisasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai  $b$  pada persamaan garis linier  $y = a + bx$ , sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku

residual ( $Sy/x$ .)

a. Batas deteksi (LOD)

Karena  $k = 3$ , Simpangan baku ( $S_b$ ) =  $Sy/x$ , maka :

$$LOD = \frac{3 \times Sy/x}{slope (b)}$$

b. Batas kuantitasi (LOQ)

Karena  $k = 10$ , Simpangan baku ( $S_b$ ) =  $Sy/x$ , maka

$$LOQ = \frac{10 \times Sy/x}{slope (b)}$$

Keterangan :  $S_b = Sy/x$  : simpangan baku respon analitik dari blanko

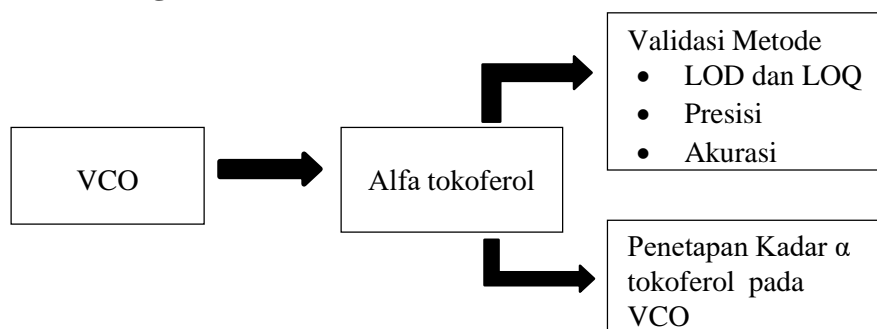
$K$  : batas deteksi

Slope ( $b$ ) : arah garis linear pada persamaan

$$(y = bx + a)$$

(Riyanto, 2014).

## B. Kerangka Pemikiran



Gambar 3. Kerangka pemikiran

Kandungan salah satu senyawa antioksidan dalam VCO yaitu  $\alpha$  - tokoferol . Senyawa  $\alpha$  - tokoferol juga sering dikenal sebagai vitamin E. VitaminE dapat mengurangi tekanan oksidatif, yaitu suatu keadaan saat

tingkat oksigenreaktif intermediat (*reactive oxygen intermediate*, ROI) melebihi pertahanan antioksidan endogen yang diakibatkan oleh paparan sinar UV (Nova & Laila, 2022). Selain itu, vitamin E tersebut juga dapat bekerja memutuskan reaksi oksidasi dalam fase lipid untuk menangkalkan aktivitas radikal (*reactive oxygen intermediate*, ROI)(Yusra, 2022). Tokoferol memiliki sifat penstabil efek pada stabilitas minyak kelapa selama pengolahan (Adejumo et al., 2021). Pada beberapa proses pembuatan VCO beberapa tokoferol dihilangkan karena menggunakan proses pemanasan dan menyebabkan pada hilangnya stabilitas VCO karena oksidasi

Salah satu metode untuk mengetahui kualitas VCO adalah dengan mengetahui kadar  $\alpha$  - tokoferol yang terkandung didalamnya. KCKT adalah metode yang baik dan linier dalam rentang kalibrasi dipelajari untuk kuantitatif penilaian  $\alpha$  - tokoferol dalam minyak nabati (Adejumo et al., 2021). Keunggulan metoda ini dibanding metoda pemisahan lainnya terletak pada ketepatan analisis dan kepekaan yang tinggi serta cocok untuk memisahkan senyawa- senyawa *nonvolatile* yang tidak tahan pada pemanasan (Susanti & Dachriyanus, 2017).

Pada penelitian ini terlebih dahulu dilakukan uji validasi metode, data validasi yang diperoleh menjadi parameter untuk menentukan metode yang telah digunakan mempunyai ketangguhan kerja atau tidak dalam menentukan kandungan kadar  $\alpha$  - tokoferol dalam VCO. Validasi metode yang diuji meliputi LOD, LOQ, Presisi dan Akurasi. Selanjutnya

dilakukan penetapan kadar  $\alpha$  - tokoferol dalam VCO menggunakan metode KCKT berdasar metode yang telah tervalidasi.

### **C. Hipotesis**

H1 : Analisis Alfa tokoferol pada VCO dapat dilakukan dengan KCKT.