

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Zaitun

1. Morfologi Dan Klasifikasi Tanaman

Tanaman zaitun memiliki batang pohon yang sangat tebal dan tingginya sekitar 10 meter. Batang zaitun memiliki diameter yang lebar dan kebanyakan membengkok dan memiliki cabang yang banyak. Zaitun memiliki daun yang bentuknya memanjang, ukurannya kecil, pendek, tekstur kasar dan permukaan atas warna hijau tua hingga pucat dan permukaan bawah warna keabu-abuan. Daunnya berukuran 4-10 cm dan lebar antara 1-3 cm. Bunganya kecil dan berwarna putih hingga krem, serta memiliki kelopak 4 lobus. Buah zaitun memiliki biji yang keras dan kulit berwarna hitam keunguan.



Gambar 1. Tanaman zaitun
(Sumber : Agrotek.id)

Menurut Johnson (2005), klasifikasi tumbuhan zaitun (*Olea europaea* L.)

yaitu :

Kingdom	: Green Plants
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Asteridae
Famili	: Oleaceae-ash
Sub-famili	: Oleoideae
Genus	: <i>Olea</i>
Spesies	: <i>Olea europaea</i>

2. Tempat Tumbuh dan Distribusi Tanaman

Tanaman zaitun merupakan tanaman yang berasal dari daerah Mediterania yang penyebarannya sangat luas hingga ke negara tetangga seperti Portugal, Spanyol, Italia, Prancis dan Yunani. Tahun 1560 penjelajah dari Spanyol membawa biji tanaman zaitun dari Peru dan zaitun ditemukan di Meksiko. Zaitun dibawa dari Meksiko menuju California oleh tentara Prancis. Pada tahun 1803 pembuatan zaitun mulai disebutkan pertama kali pada buku "*San Diego de Alcalá Mission*". Penyebaran zaitun mulai meluas hingga daerah Asia dan Afrika (Kamila, 2016).

Tanaman zaitun bisa tumbuh dengan letak geografis 30°C hingga 45°C dari garis ekuator dan pada kawasan tropis dan subtropis. Pada suhu dibawah 10°C maka zaitun tidak dapat tumbuh. Indonesia merupakan negara yang beriklim tropis karena memiliki sinar cahaya matahari relatif tinggi sehingga tanaman zaitun sangat mudah tumbuh di Indonesia. 7000 tahun silam budidaya tanaman zaitun telah dilakukan dibuktikan oleh sebuah arkeologi yang menunjukkan bahwa tanaman zaitun sudah ditanam di Crete 3000 tahun SM. Banyak buku telah menyebutkan manfaat minyak zaitun sebagai kesehatan salah satunya di Naskah Yunani kuno (Kamila, 2016).

3. Kandungan Kimia

Minyak dan daun zaitun mengandung 30 komponen fenolik dimana konsentrasi komponennya sama setiap bagian termasuk oleuropein, hidroxitirosol, dan tyrosol, luteolin, katekin, dan apigenin (Kamila, 2016). Fenolik dalam minyak zaitun memiliki peran meminimalkan resiko penumpukan lemak dan kolesterol (aterosklerosis), gangguan pada jantung, kematian pada sel neuron (neurodegeneratif) dan berbagai jenis kanker. Kandungan dari minyak zaitun baik untuk terapi penurunan berat badan (Purwaniati, 2019). Polifenol berkhasiat dalam memperbaiki fungsi kolesterol baik tubuh (HDL), antihipertensi, dan memperbaiki fungsi endothelial (Purwaniati, 2019).

Extra virgin olive oil dapat memperbaiki sistem imun dan inflamasi karena memiliki komponen senyawa minor yang terbukti bermanfaat, seperti rheumatoid

arthritis, lupus eritematosus sistemik dan sklerosis (Purwaniati, 2019). Minyak zaitun mengandung fenolik yang mempunyai senyawa utama hidrokortisol dan oleuropein yang memiliki efek antioksidan (Purwaniati, 2019). Minyak zaitun mengandung 72% asam oleat yang merupakan asam lemak tak jenuh tunggal (Purwaniati, 2019). Minyak zaitun tidak mengandung lemak tak jenuh ganda sehingga aman bagi tubuh. Contoh Asam lemak tak jenuh ganda adalah asam linoleat, asam oleat memiliki satu ikatan rangkap, dapat bertindak sebagai antioksidan karena tidak mudah teroksidasi, stabilitasnya lebih tinggi, dapat disimpan dalam waktu yang lama dan memiliki peran penting dalam mencegah kanker (Purwaniati, 2019). Asam oleat sangat penting dalam mencegah pertumbuhan sel kanker karena berperan membuang sel yang tidak diperlukan tubuh (apoptosis) dan perkembangan sel (diferensiasi) (Purwaniati, 2019).

4. Minyak Zaitun

Minyak zaitun diambil dari buah yang sudah matang berwarna ungu kehitaman dan di ekstrak untuk pembuatan minyak (Nevy, 2009). Berdasarkan jenisnya minyak zaitun dibagi menjadi lima jenis yaitu :

4.1 *Extra-Virgin Olive Oil*. Memiliki tingkat keasaman <1% yang dihasilkan dari perasan pertama dan dianjurkan diminum secara langsung untuk kesehatan.

4.2 *Virgin Olive Oil*. *Virgin olive oil* memiliki keasaman yang lebih tinggi dan diambil dari buah yang sudah matang.

4.3 *Refined Olive Oil*. Memiliki keasaman >3.3% dihasilkan dari penyulingan, aroma dan rasanya tidak begitu enak.

4.4 *Pure Olive Oil*. Merupakan minyak zaitun paling banyak dijual di pasaran karena warna, aroma, rasanya lebih ringan daripada *virgin olive oil*.

4.5 *Extra-Light Olive Oil*. Dihasilkan dari hasil sulingan dan campuran minyak zaitun murni sehingga kualitasnya rendah. Namun, jenis ini cukup populer dan diminati.

(Purwaniati *et al.*, 2019).

5. Manfaat Minyak Zaitun

Menurut Habbah (2008), *Olive oil* memiliki beberapa kegunaan yaitu melindungi tubuh dari serangan kardiovaskuler terutama jantung koroner, melindungi dari kenaikan LDL, mencegah hipertensi, serta diabetes, obesitas, dan mencegah terjadinya jenis kanker. Minyak zaitun mengurangi resiko terjadinya gumpalan darah (trombosis) dan penumpukan lemak pada pembuluh darah (aterosklerosis). Minyak zaitun mengandung nutrisi yang bisa mengurangi terjadinya koagulasi, mengurangi terjadinya penebalan pembuluh nadi jantung, meningkatkan efek antioksidan didalam plasma serta melindungi oksidasi kolesterol buruk.

6. Farmakokinetik Zaitun

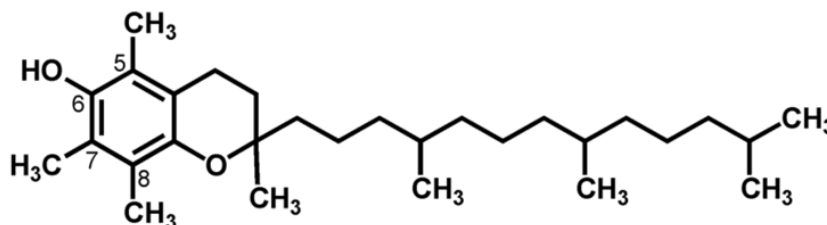
Kandungan senyawa oleuropein paling banyak terdapat pada daun zaitun dibandingkan tanaman lain. Dalam farmakokinetik tubuh senyawa Oleuropein akan mengalami beberapa tahapan. Oleuropein akan diabsorbsi dalam usus halus ketika obat diberikan secara oral. Bioavailabilitas dan daya absorpsi yang dimiliki oleh senyawa Oleuropein memiliki tingkat yang baik. Oleuropein merupakan obat herbal yang akan terdistribusi secara menyeluruh di dalam darah. Metabolisme terjadi di organ hati ditujukan untuk mengubah obat bersifat non polar menjadi polar agar mudah diekskresikan. Reaksi fase I, proses hidrolisis akan dialami oleh oleuropein sehingga terbentuk hidrokortison yang memiliki sifat lebih polar. Fase II, terjadi reaksi konjugasi dengan substrat endogen seperti asam sulfat pada glukoronidasi dan sulfat, sehingga pada fase II menjadi sangat larut dalam air, dan proses ekskresinya terjadi di ginjal. Pada proses ekskresi glukoronidasi banyak ditemukan komponen hidrokortison (Kamila, 2016).

B. Tokoferol (Vitamin E)

Tokoferol atau vitamin E dalam minyak makan memiliki fitonutrien yang sangat penting bagi tubuh. Adanya gugus fenol pada cincin 6-kromanol dapat bertindak sebagai antioksidan. Vitamin E terbagi menjadi beberapa jenis, yaitu α -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol, dan tokotrienol (Hilma.,*et al.*2018)

1. α -Tokoferol

Menurut FI Edisi VI (2014) dan NIH (2021) α -Tokoferol memiliki struktur dan sifat-sifat antara lain :



Gambar 2. Struktur Kimia α -Tokoferol
(Sumber : Wikipedia.org)

1.1 Rumus Kimia. $C_{29}H_{50}O_2$

1.2 Pemerian. Tidak memiliki rasa dan sangat praktis tidak memiliki bau yang khas. Bentuk α -tokoferol dan α -tokoferol asetat berupa minyak kental jernih, memiliki warna kuning hingga kehijauan. α -tokoferol memiliki stabilitas yang rendah terhadap udara dan cahaya terutama dalam suasana yang asam. Bentuk ester stabil terhadap udara dan cahaya, tetapi stabilitasnya rendah pada suasana asam.

1.3 Stabilitas. α -tokoferol tidak stabil terhadap udara dan cahaya. Bentuk ester stabil terhadap udara dan cahaya. Golongan α -tokoferol dan esternya tidak stabil dalam suasana alkalis.

1.4 Sinonim. 3,4-dihydro-2,5,7, 8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyl tetradecyl)-2H-benzopyran-6-ol ; 2,5,7,8 tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyl decyl) -6chromanol ; α tokoferol ; 5,7,8-trimethyl tocol ; vitamin entisterilitas ; Eprolin S ; Epsilan ; Ephynal ; Synthoperol ; E-vimin ; Evipherol ; Etavil ; Phytogermie ; Profecundin ; Tocopharm ; Viprimol ; Viteolin ; Esorb ; Vacuals ; Covitol ; Evion.

1.5 Log P. 12,2

1.6 pKa. 10,8

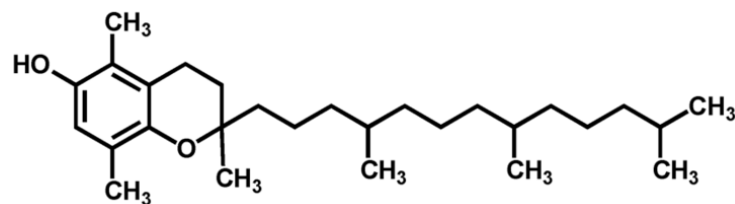
1.7 Berat Molekul. 430,7 g/mol

1.8 Kelarutan. Tidak dapat larut air, mudah larut dalam etanol, mudah bercampur dengan eter, aseton, dan dengan minyak dari tanaman (nabati), kloroform.

1.9 Kegunaan. Bertindak sebagai zat antioksidan didalam lemak sayur dan minyak, untuk mengobati kekurangan vitamin E dalam tubuh, dan mencegah agar tidak mengalami perubahan secara fisika dan kimia sel, jaringan atau organ (degenerasi).

2. β -Tokoferol

Menurut NIH (2021) β -tokoferol memiliki struktur dan sifa-sifat antara lain :



Gambar 3. Struktur Kimia β -Tokoferol
(Sumber : MDPI Google.com)

2.1 Rumus Kimia. $C_{28}H_{48}O_2$

2.2 Sinonim. 3,4-dihydro-2,5,8-trimethyl-2-(4,8,12-trimethyl tetradecyl)-2H-1-benzopyran-6-ol ; 5,8-dimethyl tocol.

2.3 Log P. 8,81

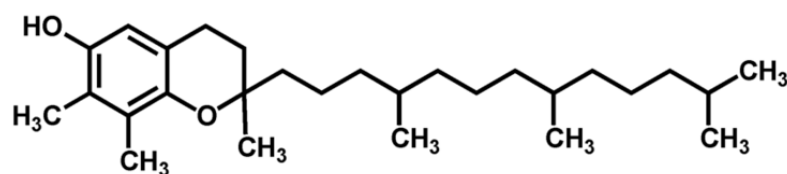
2.4 pKa. 10,47

2.5 Titik Lebur. $<25^{\circ}C$

2.6 BM. 416,7 g/mol

3. γ -tokoferol

Menurut NIH (2020) γ -tokoferol memiliki struktur dan sifat-sifat antara lain :



Gambar 4. Struktur Kimia γ -Tokoferol
(Sumber : MDPI Google.com)

3.1 Rumus Kimia. $C_{28}H_{48}O_2$

3.2 Sinonim. (2R) -3-,4-dihydro-2,7, 8-trimethyl-2- (4R,8R) -4,8,12-trimethoxy octyl-2H-1-benzopyran-6-ol ; 7,8-dimethyl tocol.

3.3 Log P. 8,81

3.4 pKa. 10,47

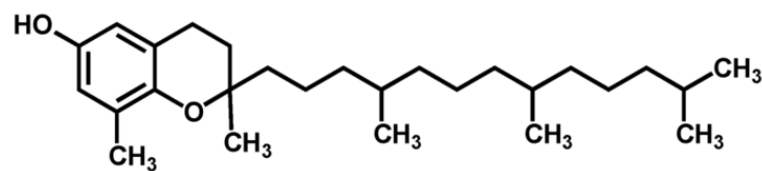
3.5 BM. 416,7 g/mol

3.6 Kelarutan. 128 mg/mL dalam air

3.7 Kegunaan. Menghambat aktivitas siklooksigenase sebagai anti inflamasi

4. δ -Tokoferol

Menurut NIH (2020) δ -tokoferol memiliki struktur dan sifa-sifat antara lain :



Gambar 5. Struktur Kimia δ -Tokoferol
(Sumber : MDPI Google.com)

1.1 Rumus Kimia. $C_{27}H_{46}O_2$

1.2 Sinonim. (2R) -3,4-dihydro-2,8-dimethyl-2-(4R,8R)-4,8,12- trimethyl decyl -2H-1-benzopyran-6-ol ; 8-methyl tocol.

1.3 Log P. 8,76

1.4 pKa. 10,14

1.5 BM. 402,65 g/mol

1.6 Titik lebur. $<25^{\circ}C$

1.7 Kelarutan. $1,1e-05$ g/L

5. Tokoferol Sebagai Antioksidan

Vitamin E memiliki fungsi utama yang dapat menstimulasi respon imunologi dan sebagai zat antioksidan, kemampuan peningkatan imunologi terlihat dalam peningkatan kekebalan tubuh. Ketika kadar vitamin E dalam tubuh tinggi maka terjadinya infeksi akan rendah. Nitrosamin merupakan promotor dari tumor kanker yang berbahaya bagi tubuh, sehingga vitamin E sangat dibutuhkan karena bisa menghambat perubahan nitrit pada asap rokok menjadi nitrosamin di dalam perut (Lamid, 1995).

Zat antioksidan pada vitamin E dapat bekerja mempermudah proses oksidasi, sehingga vitamin E dapat melindungi senyawa lain dari oksidasi. Vitamin E merupakan pertahanan utama melawan oksigen perusak, lipid peroksida, dan radikal bebas, serta menghentikan reaksi berantai dari radikal bebas. Pada sel membran vitamin E akan mencegah oksidasi lemak khususnya *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA), serta senyawa lain seperti vitamin A. Vitamin E pada mitokondria sel akan melindungi bagian metabolik yang akan mentransformasi bahan bakar energi ke dalam ATP (Lamid, 1995).

Vitamin E bersifat antioksidan merupakan pertahanan utama dalam melawan serangan radikal bebas. Radikal bebas mempunyai elektron tidak utuh dan tidak berpasangan dalam suatu molekul. Radikal bebas bersifat tidak stabil dan cepat mengalami reaksi dengan senyawa lain sehingga dapat membentuk rantai radikal bebas. Radikal bebas terbentuk dari reaksi kimia yang berlangsung sangat panjang di dalam tubuh atau hasil pencemaran lingkungan seperti nitrogen, dioksida, ozon, logam berat, asap rokok. Bila paru-paru tercemar ozon menyebabkan peroksidasi dari sel-sel membran lemak menghasilkan suatu produk pentan. DNA merupakan target awal radikal bebas dalam merusak pertumbuhan sel yang termasuk DNA dan PUFA. Ketika PUFA bereaksi dengan radikal bebas akan menghasilkan terbentuknya radikal bebas dalam jumlah yang banyak (Lamid, 1995).

Adanya sifat antioksidan dari vitamin E, sel dan komponen tubuh yang lain akan melindungi dari serangan radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai atau oksidasi merusak. Vitamin E akan mencegah kerusakan DNA yang menyebabkan mutasi, mempertahankan LDL, dan unsur tubuh yang kaya lemak melawan oksidasi. Vitamin E sangat mudah diperoleh yaitu dari makanan biji-bijian, makanan kacang-kacangan dan makanan yang memiliki kandungan minyak nabati sangat banyak (Lamid, 1995).

Vitamin E dan Vitamin C diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Penelitian antara Vitamin E dan Vitamin C dilakukan secara *in vitro* menghasilkan informasi bahwa terdapat interaksi yang bersifat sinergistik dalam fungsinya sebagai antioksidan. Vitamin E berperan sebagai antioksidan lipofilik

sedangkan Vitamin C sebagai antioksidan hidrofilik (Rukmiasih *et al.*, 2011). Menurut Metzler (2017) vitamin C mempunyai sifat sebagai antioksidan tetapi dapat juga memicu pembentukan radikal bebas bersama-sama dengan ion Fe^{++} atau sebagai prooksidan. Vitamin C dapat melindungi tubuh dengan cara mencegah stres oksidatif pada sel-sel tubuh, sedangkan Vitamin E melindungi tubuh dengan menangkal serangan radikal bebas yang masuk kedalam tubuh.

C. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (*High Performance Liquid Chromatography*) adalah teknik yang digunakan untuk pemisahan berbagai komponen dalam suatu campuran. KCKT berguna untuk mengidentifikasi dan kuantifikasi senyawa dalam proses pengembangan obat dan telah digunakan di seluruh dunia sejak beberapa dekade (Safira *et al.*, 2019). Tujuan penggunaan KCKT adalah dapat memisahkan molekul dalam waktu yang cepat, sehingga dapat meningkatkan hasil analisis dan mengurangi tidak memerlukan waktu yang lama (Annisa, 2019).

Metode paling sederhana untuk analisis yang cepat yaitu menggunakan panjang kolom yang minimum dan kecepatan aliran yang tinggi, tetapi hal ini terdapat resiko karena campuran kompleks dari senyawa lain tidak dapat dipisahkan secara baik dan efisiensi kolom lebih rendah. Mempercepat waktu analisis selanjutnya adalah dengan memperkecil ukuran partikel, hal ini dapat menghasilkan analisis kecepatan tinggi dengan efisiensi tinggi, tetapi efek buruknya adalah tekanan balik tinggi yang tidak dapat diterima sistem KCKT konvensional dan kolom analitik konvensional (Annisa, 2019).

Prinsip kerja dari KCKT adalah larutan sampel diinjeksikan ke dalam kolom berpori (fase diam) dan cairan (fase gerak) kemudian dipompa dengan tekanan tinggi melalui kolom. Pemisahan sampel didasarkan pada perbedaan laju migrasi melalui kolom yang timbul dari partisi sampel yang berbeda antara fase diam dan fase gerak (Gupta *et al.*, 2012). KCKT lebih berguna daripada kromatografi gas karena KCKT dapat digunakan untuk sampel yang mudah menguap dan stabil secara termal, Kemudian pemilihan fase diam dan fase gerak

lebih luas. Ciri-ciri kromatografi cair kinerja tinggi dibandingkan dengan kromatografi yang lain adalah memiliki resolusi yang tinggi, diameter kecil (4,6mm), baja tahan karat, kaca atau kolom terbuat dari titanium, fase gerak yang terkontrol, analisis cepat, tekanan masuk relatif tinggi, pengepakan kolom dengan partikel sangat kecil (3,5 dan 10 μm) (Gupta *et al.*, 2012).

1. Instrumentasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Menurut buku Kromatografi Cair Kinerja Tinggi oleh Meri Susanti dan Dachriyanus (2017) instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri dari 5 komponen pokok yaitu :

1.1 Wadah fase gerak. Wadah fase gerak terbuat dari kaca atau *stainless steel* yang mampu memuat 200 sampai 1000 ml pelarut. Wadah fase gerak dapat menghilangkan gas terlarut pada fase gerak yang dapat menghambat analisis karena terbentuknya gelembung pada kolom dan detektor sehingga dilengkapi dengan alat *degasser*. Wadah fase gerak juga bisa menyaring partikel halus yang bisa mengakibatkan rusaknya sistem injektor, kolom dan pompa. Sebelum memasukkan pelarut kedalam wadah fase gerak harus disaring dengan penyaring milipore dalam kondisi vakum. Fase gerak atau eluen merupakan campuran suatu pelarut yang bisa bercampur secara homogen dan berguna dalam menentukan resolusi dan daya elusi pada saat analisis. Pemilihan fase gerak didasarkan pada viskositas rendah, transparansi terhadap UV, indeks bias, titik didih, kemurnian, inert, toksisitas, harga.

1.2 Pompa. Pompa bekerja pada tekanan tinggi karena tekanan kolom terhadap laju air juga tinggi, sehingga pompa dirancang untuk mendorong eluen melalui kolom KCKT yang dikemas rapat. Syarat pada sistem pompa KCKT yaitu memberikan tekanan yang tinggi, dapat digunakan pada kecepatan alir antara 0,1-10 ml/menit, kecepatan alir yang terkontrol dengan nilai reproduisibilitas <0,5%, tahan karat, dapat memberikan aliran sistem isokratik (Kecepatan aliran pada fase gerak tetap dari mulai analisis hingga selesai) dan gradien (pelarut campuran yang perbandingannya berubah dalam waktu tertentu). Dalam KCKT pompa terdiri atas 2 jenis yang biasa digunakan dalam penelitian yaitu :

1.2.1 Pompa tekanan tetap

Pompa ini terdiri atas pompa tekanan langsung dan pompa tekanan tetap menengah.

1.2.2 Pompa pendesakan tetap

Pompa ini terdiri atas pompa bolak-balik dan pompa pendesakan tunggal.

1.3 Injektor. Injeksi sampel merupakan tahap yang paling penting dan harus dilakukan dengan tepat. Terdapat 3 tipe dasar injektor yang bisa digunakan dalam KCKT yaitu :

1.3.1 Injektor septum

Prinsip dari injektor septum dengan cara memasukkan sampel ke dalam syringe dan diinjeksikan melalui septum elastomer.

1.3.2 Penyuntikan aliran henti

Injektor aliran henti dibuat untuk memudahkan cuplikan dalam penempatan langsung pada bagian atas kolom.

1.3.3 Katup kitar atau pipa dosis

Prinsip kerja dari katup kitar yaitu pada awal sampel dimasukkan dan ketika volume loop sudah terpenuhi, kemudian sampel menuju kolom pemisah dan volume sampel tidak mengalami pengurangan volume.

1.4 Kolom. Pemisahan komponen sampel terjadi di dalam kolom sehingga kolom merupakan komponen penting. Kolom dibuat dalam bentuk yang lurus yang dimasukkan efisiensi kolom, sehingga didapatkan harga H minimal. Kolom dibagi menjadi 2 yaitu :

1.4.1 Kolom Analitik

Kolom analitik berfungsi untuk menentukan jumlah dan jenis analit yang akan dianalisis.

1.4.2 Kolom preparatif

Kolom ini berfungsi untuk pemisahan komponen analit yang jumlahnya banyak. Pada kolom preparatif dapat mengumpulkan

tiap-tiap eluate yang keluar dari kolom. Kolom preparatif memiliki panjang antara 25-100 cm dan diameter >6mm.

1.5 Detektor. Detektor dibutuhkan pada KCKT untuk mendeteksi adanya komponen analit (analisis kualitatif) yang hasilnya dapat dielusi dari dalam kolom sehingga kadarnya bisa ditentukan. Dalam KCKT detektor dibagi menjadi 2 golongan yaitu :

1.5.1 Berdasarkan pengukuran diferensial

Sifat yang dimiliki mulai dari fase gerak hingga molekul sampel. Detektor ini dibagi menjadi detektor indeks bias, detektor konduktivitas, detektor tanpa dielektrika.

1.5.2 Berdasarkan *solute property detector*)

Pengukuran ini berdasarkan sifat yang lebih spesifik dari molekul sampel misalnya fluoresensi dan penyerapan sinar ultraviolet.

Detektor yang baik untuk analisis pada KCKT harus memiliki karakteristik antara lain memiliki sensitivitas yang memadai, stabil dan memiliki keterulangan yang baik, respon yang linier terhadap kenaikan konsentrasi, waktu respon yang singkat, kemudahan pada penggunaan, memiliki volume internal yang kecil untuk mengurangi pelebaran puncak.

2. Tipe Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

KCKT memiliki 4 tipe yang dapat digunakan dalam analisis antara lain :

2.1 Kromatografi partisi. Prinsip kerjanya dapat digunakan untuk pemisahan senyawa non ion, senyawa ion, dengan senyawa bersifat polar dengan bobot molekul <3000. Kromatografi partisi dapat dibedakan kedalam 2 kategori yaitu kromatografi fase terikat dan cair-cair. Kedua teknik kromatografi terdapat perbedaan yaitu terletak pada partikel penyangga kemasan kolom dengan metode pengikat fase diam. Kromatografi partisi cair-cair bekerja secara fisika karena fase diam diikat pada permukaan kemasan, dan kromatografi partisi bekerja secara kimia

2.2 Kromatografi adsorpsi. Kromatografi adsorpsi atau kromatografi cair padat pada fase diamnya menggunakan silika atau alumina berupa pelarut yang bersifat nonpolar dan bisa ditambah dengan pelarut polar contohnya air atau alkohol yang memiliki rantai pendek untuk meningkatkan pemisahannya sehingga tidak timbul pengekoran pada kromatogram. Kromatografi cair padat sering digunakan untuk memisahkan sampel yang tidak mudah larut dalam air. Kelebihannya mampu menganalisis perbedaan antara analit dengan gugus fungsi yang tidak sama dan campuran struktur isomer.

2.3 Kromatografi pertukaran ion. Kromatografi ini merupakan metode pemurnian dimana fase gerak bisa menukar senyawa kation atau anion pada fase diamnya. Fase diam memiliki muatan negatif dan positif karena fase diam memiliki matriks yang kuat pada permukaannya. Mekanisme pemisahannya didasarkan ada daya tarik elektrostatis

2.4 Kromatografi eklusi. Kromatografi eklusi dimana pemisahannya berdasarkan pada ukuran partikel pelarut. Kromatografi ini berfungsi untuk melakukan pemisahan antara senyawa dengan senyawa lain yang memiliki diameter berbeda dan BM yang sama.

(Susanti dan Dachriyanus, 2017).

3. Analisis kromatografi Cair Kinerja Tinggi

3.1 Analisis kualitatif. Analisis kualitatif didasarkan pada kromatogram yang secara kualitatif dapat memberikan informasi bahwa ada suatu pelarut pada suatu sampel, karena waktu retensinya bisa dilihat bahwa posisi fase diam setelah selesai dilakukan elusi. Apabila waktu retensi sampel yang dihasilkan tidak sama dengan standar maka kondisi identik tertentu dapat disimpulkan senyawa tersebut tidak terdapat didalam sampel atau kadarnya di bawah LOD.

3.2 Analisis kuantitatif. Metode ini dilakukan dengan cara membandingkan luas puncak dari solut dengan puncak standart dimana konsentrasinya telah diketahui. Hal ini didasarkan pada masa pelarut yang terkandung di dalam suatu sampel (Susanti dan Dachriyanus, 2017).

4. Keuntungan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi memiliki beberapa keuntungan yaitu waktu analisis cepat, memiliki daya pemisahan yang baik, sangat peka dan tergantung pada detektor dan pelarut yang digunakan, dapat memilih kolom dan pelarut sesuai yang dikehendaki, kolom dapat digunakan secara berulang kali, sangat efisien untuk molekul yang berukuran besar atau kecil, cuplikan dapat dengan mudah diperoleh kembali, bisa digunakan untuk sampel jika kadarnya sangat rendah.

D. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan kegiatan analisis untuk memperoleh data yang valid merupakan tujuan utama dalam metode validasi. Validasi dilakukan untuk pemastian bahwa laboratorium yang digunakan dalam penelitian mampu melakukan berbagai pengujian analisis dan diperoleh hasil yang valid dan untuk menentukan apakah metode yang digunakan telah sesuai dengan tujuan penggunaannya. Menurut Harmita (2004) terdapat macam jenis parameter analisis dimana dalam penggunaannya harus mempertimbangkan dalam validasi metode analisis dijabarkan dan diuraikan dengan cara penentuannya, antara lain :

1. Kecermatan (*accuracy*)

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Hasil dari kecermatan sangat bergantung pada sebaran galat sistematis pada saat melakukan tahapan dalam analisis. Pada pengujian senyawa obat, akurasi dapat diperoleh dengan perbandingan dari hasil pengukuran dan bahan rujukan standar (*Standard reference material*, SRM). Dalam memperoleh hasil akurasi, ICH telah memberikan rekomendasi kumpulan data dari 9x pada saat menetapkan kadar kadar dengan tiga tingkat konsentrasi yang berbeda (tiga konsentrasi dengan tiga kali replikasi) dan hasil data dinyatakan sebagai persentase perolehan kembali. Penerimaan hasil akurasi harus memenuhi kriteria dan sangat bergantung pada konsentrasi analit dalam matrik sampel dan RSD. perbedaan kadar pada berbagai

penentuan (X_d) harus 5% atau kurang pada setiap konsentrasi analit. Harga rata-rata selisih secara statistik harus 1,5% atau kurang. Kriteria tersebut dinyatakan secara tematik sebagai berikut :

$$\left\{ \frac{X_d}{X_0} \cdot 100 \right\} < 5\%$$

$$\left\{ \frac{X_d}{X_0} \cdot 100 \right\} - \frac{(S(0,95 \ n-1))}{n} < 1,5\% \quad (1)$$

Keterangan :

X_i = hasil analisis
 X_0 = hasil yang sebenarnya
 I = nilai t pada tabel t' *student* pada atas 95%
 S = simpangan baku relatif dari semua pengujian
 N = jumlah sampel yang dianalisis

Perolehan kembali juga dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Perolehan Kembali} = \frac{(C_f - C_A)}{C^*_A} \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan :

C_F = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran
 C_A = Konsentrasi sampel yang sebenarnya
 C^*_A = Konsentrasi analit yang ditambahkan

2. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan merupakan 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. Keseksamaan dinyatakan dalam simpangan baku simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan merupakan keseksamaan metode jika dilakukan secara berulang kali oleh analisis yang sama, kondisi sama dan pada waktu yang pendek atau bersamaan. Ketertiruan adalah keseksamaan metode apabila melakukannya pada saat kondisi yang berbeda. Analisis dilakukan di laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analisis yang berbeda. Metode presisi merupakan suatu kegiatan untuk menetapkan kadar pada jarak atau rentang yang dapat diterima, untuk memperoleh hasil keseksamaan

bahan campuran atau bahan partikel obat, cara berikut berguna untuk melakukan penentuan dengan metode ketertiruan yang benar. Keseksamaan dapat dihitung dengan persamaan :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3)$$

Simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dapat dihitung dengan persamaan :

$$KV = \frac{SD}{x} \times 100\% \quad (4)$$

3. Selektivitas (*spesifisitas*)

Selektivitas merupakan kemampuan yang hanya digunakan mendeteksi adanya senyawa lain yang ada didalam sampel dan dilakukan hanya untuk zat tertentu secara seksama dan cermat. Selektivitas biasanya dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

4. Linearitas dan Rentang

Linearitas merupakan kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode dari suatu sampel dapat ditentukan batas tertinggi dan terendahnya, dapat ditetapkan dan ditunjukkan dengan parameter presisi, akurasi, dan linearitas dimana hasilnya sudah bisa diterima. Variasi sekitar arah garis regresi yang bisa dihitung dilihat dari persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil pengujian analit dalam sampel menggunakan beberapa variasi konsentrasi yang digunakan. Perlakuan tematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $Y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada daerah garis. Nilai a menunjukkan kepekaan analisis

terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung yaitu simpangan baku residual (S_y), yaitu :

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y_1 - \bar{y})^2}{N - 2}} \quad (5)$$

$$\bar{y}_1 = a + bx$$

Keterangan :

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b}$$

S_{x_0} = standar deviasi dari fungsi

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{x}$$

V_{x_0} = koefisien variasi dari fungsi

5. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi merupakan jumlah yang sangat kecil analit dalam sampel yang masih bisa terdeteksi dan mampu memberikan respon signifikan yang dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Dalam menentukan batas deteksi suatu metode memiliki cara yang berbeda-beda sesuai dengan metode analisis tersebut ingin menggunakan instrumen atau tidak. Pada analisis yang tidak menggunakan instrumen batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat. Nilai k untuk batas deteksi 3 dan batas kuantitasi 10, simpangan baku ($S_b = S_y/x$, maka :

$$\text{Batas deteksi : LOD} = \frac{3,3 \left(\frac{S_y}{x} \right)}{b} \quad (6)$$

$$\text{Batas kuantitas : LOQ} = \frac{10 \left(\frac{S_y}{x} \right)}{b} \quad (7)$$

6. Kekuatan (*robustness*)

Kekuatan digunakan untuk memvalidasi suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi. Identifikasi sekurang-kurangnya 3 faktor analisis yang dapat mempengaruhi hasil bila diganti atau diubah.

E. Landasan Teori

Indonesia memiliki masyarakat dimana sebagian besar masih menggunakan bahan alam untuk kebutuhan tertentu salah satunya dalam bidang kesehatan. Salah satu tanaman obat yang sering digunakan adalah tanaman zaitun jenis *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) yang dimanfaatkan minyaknya untuk kesehatan karena khasiatnya sudah terbukti manjur. Minyak zaitun mengandung banyak zat aktif salah satunya berupa α -tokoferol atau vitamin E yang berfungsi sebagai zat antioksidan. α -tokoferol memiliki sifat tidak stabil terutama terhadap oksidasi dan ditempatkan pada suhu yang tinggi (Harlen 2017).

Berdasarkan penelitian Amelia *et al* (2014), α -tokoferol yang terdapat pada minyak biji kelor telah melewati tahapan validasi metode analisis menggunakan instrumen KCKT dan penetapan kadar menggunakan pelarut etanol:tetrahydrofuran dinyatakan memiliki hasil yang valid sesuai dengan parameter validasi yang menghasilkan nilai akurasi sebesar 95,8% dan kadar sebesar 0,37% (b/b) menggunakan fase gerak metanol. Hasil tersebut masuk ke dalam rentang *recovery factor* menurut AOAC SMPR (2011) untuk analisis vitamin E yaitu 90%-110%. Dari penelitian tersebut maka metode yang digunakan memberikan hasil yang dapat dipercaya untuk dilakukan penelitian selanjutnya.

Berdasarkan penelitian Nafie (2015) telah dilakukan validasi metode analisis α -tokoferol pada minyak jagung menggunakan pelarut propanolol. Kondisi optimum yang digunakan yaitu pada panjang gelombang 290 μ m dan fase gerak metanol. Laju alir terpilih yaitu 1,5 mL/menit menghasilkan koefisien korelasi (r) 0,999 nilai mendekati 1 dapat diartikan bahwa luas puncak kromatogram semakin linier dengan konsentrasi dan didapatkan kadar α -tokoferol sebesar 40,6%. Hasil analisis α -tokoferol dalam minyak jagung memenuhi persyaratan validasi berdasarkan ICH (2005), sehingga metode yang digunakan dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya. Menurut penelitian Amitri (2010) nilai HETP sangat berpengaruh dalam menentukan kecepatan alir, dalam penelitian disimpulkan bahwa laju alir 1 mL/menit memiliki nilai yang lebih baik dari pada kecepatan alir lain karena memiliki nilai HETP yang kecil.

Pemilihan fase gerak berdasarkan penelitian (Amelia *et al* 2014, Nafie 2015) yaitu dengan menggunakan pelarut metanol karena memberikan hasil pemisahan yang baik terhadap α -tokoferol. Menurut penelitian Yulianthi *et al* (2017) dilakukan penetapan kadar α -tokoferol pada rumput laut coklat (*Sargassum polycystum*) menggunakan pelarut aseton menghasilkan kadar α -tokoferol sebesar 8,18% (b/b) dengan konstanta dielektrik sebesar 20,70. Tingkat kepolaran aseton lebih rendah sehingga mampu mengekstrak α -tokoferol lebih efektif. Penelitian ini dilakukan perbandingan variasi kecepatan alir yaitu 1 mL/menit, 1.5 mL/menit, 2 mL/menit untuk melihat kondisi yang optimum dalam menganalisis α -tokoferol dalam minyak zaitun.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) kolom fase terbalik (*reserved-phase*) C_{18} -bonded silica merupakan metode yang paling tepat untuk tujuan kuantifikasi dan karakterisasi vitamin E. KCKT memiliki tingkat efisiensi tinggi dalam adsorpsi. Sebelum menggunakan KCKT para peneliti menggunakan metode Kromatografi Gas (GC) untuk menganalisis vitamin E, namun sampel yang diuji harus melalui tahap saponifikasi sehingga lebih rumit dalam proses analisisnya. Kolom fase terbalik (*reserved-phase*) C_{18} -bonded silica digunakan untuk memisahkan isomer tertentu termasuk senyawa α -tokoferol (Martha *et al.*, 2013)

Metode KCKT yang optimum harus dilakukan validasi supaya hasil yang didapatkan bisa dipertanggung jawabkan dan dilakukannya validasi dapat memberikan jaminan bahwa metode yang digunakan dimana persyaratan analisis sudah terpenuhi. Parameter validasi meliputi akurasi yang ditentukan dengan persen perolehan kembali, presisi yang dinyatakan dalam *Coefficient of Variation* (CV), linearitas yang ditentukan dengan nilai koefisien korelasi (r), LOD, dan LOQ.

F. Hipotesis

Hipotesis disusun berdasarkan landasan teori, sehingga hipotesis dalam penelitian ini adalah :

Pertama, α -tokoferol dalam minyak zaitun dapat dianalisis pada kondisi yang optimum menggunakan KCKT.

Kedua, α -tokoferol dapat diperoleh kadarnya pada minyak zaitun jenis *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) dengan metode KCKT menggunakan pelarut aseton.