

**VALIDASI METODE ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR
KAFEIN MENGGUNAKAN METODE KCKT FASE
TERBALIK PADA SAMPEL TEH HITAM DARI PTPN XII
LAWANG JAWA TIMUR**

SKRIPSI



Oleh :

Dyah Purwaning Tyas

NIM. 17040060

PROGRAM STUDI PROGRAM SARJANA FARMASI

FAKULTAS ILMU KESEHATAN

UNIVERSITAS dr. SOEBANDI JEMBER

2021

**VALIDASI METODE ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR
KAFEIN MENGGUNAKAN METODE KCKT FASE
TERBALIK PADA SAMPEL TEH HITAM DARI PTPN XII
LAWANG JAWA TIMUR**

SKRIPSI

Untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Sarjana Farmasi



Oleh :

Dyah Purwaning Tyas

NIM. 17040060

**PROGRAM STUDI PROGRAM SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITASdr. SOEBANDI JEMBER**

2021

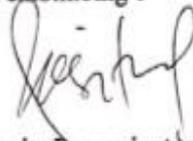
LEMBAR PERSETUJUAN

Skripsi ini telah diperiksa oleh pembimbing dan telah disetujui untuk mengikuti seminar hasil penelitian pada Program Studi Sarjana Farmasi

Universitas dr.Soebandi

Jember, 10 Agustus 2021

Pembimbing I



Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm

NIDN.0001028102

Pembimbing II



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm

NIDN.0703068903

HALAMAN PENGESAHAN

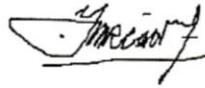
Tugas Akhir yang berjudul *Validasi Metode Analisis dan Penetapan Kadar Kafein Menggunakan Metode KCKT Fase Terbalik Pada Sampel Teh Hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur* telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada :

Hari : Jumat

Tanggal : 20 Agustus 2021

Tempat : Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi Jember

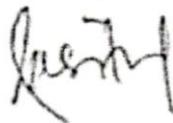
Tim Penguji
Ketua,



Jamhariyah, S. ST., M.Kes

NIDN.4001116401

Penguji II,



Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm

NIDN.0001028102

Penguji III,



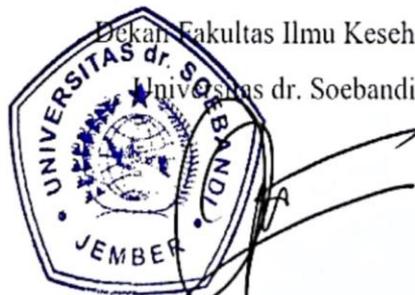
apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm

NIDN.0703068903

Mengesahkan

Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan

Universitas dr. Soebandi,



Hella Meldy Tursina, S.Kep., Ns., M.Kep

NIDN. 0706109104

TUGAS AKHIR
VALIDASI METODE ANALISIS DAN PENETAPAN KADAR KAFEIN
MENGGUNAKAN METODE KCKT FASE TERBALIK PADA SAMPEL
TEH HITAM DARI PTPN XII LAWANG JAWA TIMUR

Oleh :

Dyah Purwaning Tyas
17040060

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr.apr. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm

Dosen Pembimbing Anggota: apr. Lindawati Setyaningrum, M.Farm

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dyah Purwaning Tyas
Tempat, Tanggal Lahir : Jember, 21 September 1998
Nim : 17040060

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa penulisan skripsi yang berjudul “Validasi Metode Analisis dan Penetapan Kadar Kafein Menggunakan Metode KCKT Fase Terbalik pada Sampel Teh Hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur” ini adalah asli dan belum diajukan sebagai syarat penelitian, baik di Universitas dr. Soebandi Jember maupun di perguruan tinggi lain. Skripsi ini murni gagasan dan rumusan saya sendiri tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan Tim Pembimbing. Dalam perumusan skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat orang lain yang telah ditulis serta dipublikasikan, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan dalam daftar pustaka, apabila dikemudian hari terdapat penyimpanan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik dan atau sanksi lainnya, sesuai dengan norma yang berlaku dalam perguruan tinggi lain.

Jember, Agustus 2021

Yang menyatakan



Dyah Purwaning Tyas
Nim. 17040060

KATA PENGANTAR

Segalapuji dan syukur kepada Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya semata sehingga penyusunan proposal skripsi ini dapat terselesaikan. Naskah skripsi disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan menyelesaikan pendidikan Program Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi dengan judul “Validasi Metode Analisis dan Penetapan Kadar Kafein Menggunakan Metode KCKT Fase Terbalik pada Sampel Teh Hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur”.

Penyusunannya dapat terlaksana dengan baik berkat dukungan dan bimbingan dari banyak pihak. Untuk itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Hella Meldy Tursina, S.Kep., Ns., M.Kep selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
2. Ibu apt. Dhina Ayu Susanti, S.Farm.,M.Kes selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi
3. Ibu Dr.apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm selaku dosen pembimbing 1
4. Ibu apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku dosen pembimbing 2
5. Ibu Jamhariyah, S.ST., M.Kes selaku dosen penguji
6. Seluruh ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas dr. Soebandi jember yang telah memberikan ilmu dan arahan untuk menyelesaikan skripsi dengan baik.
7. Kepada kedua orang tuaku dan semua keluarga yang telah memberi semangat, dukungan, perhatian dan do'a setiap hari.

8. Teman-teman terdekat dan teman seperjuangan farmasi yang telah mensupport dan memberikan semangat.
9. Para pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas semua dukungan dan bantuannya.

Penulis menyadari proposal skripsi ini tidak luput dari berbagai kekurangan. Penulis mengharapkan saran dan kritik demi kesempurnaan dan perbaikannya sehingga akhirnya laporan proposal skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi bidang pendidikan dan penerapan di lapangan serta bisa dikembangkan lagi lebih lanjut.

Jember, Agustus 2021

Penulis

ABSTRAK

Tyas, Dyah, Purwaning.*, Puspaningtyas Ayik R. **, Setyaningrum Lindawati. ***. 2021. *Validasi Metode Analisis dan Penetapan Kadar Kafein Menggunakan Metode KCKT Fase Terbalik pada Sampel Teh Hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur*. Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember.

Teh hitam adalah teh yang telah mengalami proses oksidasi enzimatis dan produk yang banyak dikonsumsi sebagai minuman. Teh mengandung beberapa alkaloid salah satunya kafein. Kafein memiliki efek farmakologis mengurangi risiko *stroke*, antidiabetes dan antihipertensi. Metodologi penelitian ini eksperimental kuantitatif menggunakan sampel teh, khususnya teh bubuk hitam dari PTPN XII Lawang Jawa Timur dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik untuk memisahkan senyawa kafein dengan senyawa lainnya yang terkandung pada teh hitam. Penelitian ini untuk mengetahui dan mendapatkan kondisi optimum KCKT fase terbalik yang meliputi laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang agar memenuhi persyaratan validasi metode analisis serta untuk mengetahui kadar kafein dalam teh hitam.

Kondisi KCKT dengan fase diam kolom *poroshell* C-18 untuk validasi metode analisis dan penetapan kadar kafein pada sampel teh hitam yang digunakan merupakan hasil optimasi metode analisis yakni laju alir 1,0 mL/menit, fase gerak asetonitril : *methanol* : *aquabidestilata* (80:5:15) diamati pada panjang gelombang 272 nm. Hasil penelitian menunjukkan uji validasi memenuhi persyaratan parameter validasi meliputi uji presisi %KV 0,73326%, uji akurasi menghasilkan % *recovery* 98,67% - 100%, selektivitas yang baik, linieritas dengan nilai $r = 0,9995$ serta nilai $V_x 0,11201\%$, LOD 8,78525 ppm, dan LOQ 29,28418 ppm. Kadar rata-rata kafein dalam sampel teh hitam 6,57650% (%b/b). Metode analisis yang telah divalidasi dapat diaplikasikan pada penetapan kadar kafein dalam sampel teh hitam. Perlu dilakukan optimasi kondisi kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) fase terbalik lebih baik lagi, agar kondisi terpilih stabil pada analisis rutin jika dilakukan pada sampel yang berbeda.

Kata kunci : teh hitam, kafein, KCKT, validasi metode, dan penetapan kadar

* Peneliti

** Pembimbing 1

*** Pembimbing 2

ABSTRACT

Tyas, Dyah, Purwaning.*, Puspaningtyas Ayik R. **, Setyaningrum Lindawati. ***. 2021. *Validation of Analysis Method and Determination of Caffeine Content Using Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography Method in Black Tea Sample from PTPN XII, Lawang, East Java*. Undergraduate Thesis. Study Program of Pharmacy Bachelor, Dr. Soebandi University of Health Sciences, Jember.

Black tea is tea that has undergone an enzymatic oxidation process and it is a product that is consumed as a drink. Tea contains some alkaloids, one of them is caffeine. Caffeine has pharmacological effect such as reduce the risk of stroke, antidiabetic, and antihypertension. The method of this study was quantitative experimental by using samples of tea, especially powdered black tea from PTPN XII, Lawang, East Java that was done by using reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method in order to separate the caffeine substance from other substances that are contained in black tea. This study aims to find out and obtain the optimum conditions for reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) that include flow rate, mobile phase, and wavelength in order to meet the requirements of analysis method validation and to find out caffeine content in black tea.

HPLC condition with stationary phase of poroshell C-18 (4,6 x 150 mm) which was used for validation of the analysis method and determination of caffeine content in black tea samples was the optimization results of analysis method by the flow rate was 1,0 mL/minute, a mobile phase of acetonitrile : methanol : aquabidestilata (80:5:15), and it was observed at wavelength of 272 nm. The result showed that the validation test met the requirement of validation parameters that include precision test was %KV 0,73326%, accuracy test was 98,67%-100% recovery, Good selectivity, linearity with its correlation value (r): 0,9995, V_{x0} value 0,11201% with LOD was 8,78625 ppm, and LOQ was 29,28418 ppm. The average caffeine content in black tea sample was 6,57650% (%b/b). Analysis method that has been validated can be applied to determination of caffeine content in black tea samples. It needs to do better optimization of reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) conditions in order to the selected condition can be stable on routine analysis if it is carried out on different samples.

Keywords : black tea, caffeine, HPLC, validation of method, and determination of caffeine content

* Author

** Advisor 1

*** Advisor 2

Daftar Isi

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN JUDUL DALAM	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN ORISINALITAS	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB. 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
a. Tujuan Umum.....	5
b. Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB. 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1Teh.	7
2.1.1Pengertian Teh.....	7
2.1.2 Klasifikasi Teh.....	9
2.1.3 Manfaat Teh.....	10
2.1.4Kandungan Teh	11
2.2Kafein	14
2.2.1 Struktur Kafein	15

2.2.2	Sifat Fisika Kimia Kafein	15
2.2.3	Mekanisme Kerja Kafein	16
2.3	Tinjauan tentang ekstraksi	17
2.3.1	Tinjauan tentang ekstrak	21
2.4	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	21
2.4.1	Pengertian KCKT	22
2.4.2	Prinsip Kerja KCKT	24
2.4.3	Ruang Lingkup KCKT	24
2.4.4	Keuntungan KCKT	25
2.4.5	Bagian-bagian KCKT	26
2.4.6	Tipe-tipe KCKT	30
2.5	Validasi Metode Analisis	32
2.5.1	Akurasi	35
2.5.2	Presisi	37
2.5.3	Selektifitas	39
2.5.4	Linieritas dan Rentang	40
2.5.5	Batas Deteksi (LOD)	42
2.5.6	Batas Kuantitasi (LOQ)	42
2.5.7	Uji Kesesuaian Sistem	43
2.6	Penetapan Kadar	43
BAB. 3	KERANGKA KONSEP	45
3.1	Bagan Kerangka Konsep	45
3.2	Hipotesa Penelitian	46
BAB. 4	METODOLOGI PENELITIAN	47
4.1	Desain Penelitian	47
4.2	Populasi dan Sampel	47
4.2.1	Populasi	47
4.2.2	Sampel	47
4.3	Tempat & Waktu Penelitian	47
4.4	Definisi Operasional	48
4.5	Instrumen Pengumpulan Data	50

4.6 Tahapan Penelitian.....	50
4.7 Aplikasi Metode Analisis	55
BAB. 5 HASIL PENELITIAN	56
BAB. 6 PEMBAHASAN PENELITIAN	72
BAB. 7 KESIMPULAN DAN SARAN	81
7.1 Kesimpulan	81
7.2 Saran	82
DAFTAR PUSTAKA	84

Daftar Tabel

Tabel 2.1 Komponen data validasi metode	33
Tabel 2.2 Persyaratan % <i>recovery</i>	37
Tabel 2.3 Persyaratan presisi.....	39
Tabel 4.1 Definisi operasional	48
Tabel 5.1 Hasil optimasi laju alir pada KCKT.....	58
Tabel 5.2 Data waktu retensi komposisi fase gerak terpilih	60
Tabel 5.3 Hasil uji kesesuaian sistem	62
Tabel 5.4 Data resolusi kafein pada sampel teh hitam.....	65
Tabel 5.5 Kurva baku linieritas standar kafein	66
Tabel 5.6 Nilai kurva baku LOD & LOQ	68
Tabel 5.7 Nilai presisi konsentrasi 80%	69
Tabel 5.8 Nilai presisi konsentrasi 100%	70
Tabel 5.9 Nilai presisi konsentrasi 120%	70
Tabel 5.10 Hasil uji akurasi	71
Tabel 5.11 Kurva baku penetapan kadar.....	72
Tabel 5.12 Data penetapan kadar sampel teh hitam.....	73

Daftar Gambar

Gambar 2.1 Daun teh	8
Gambar 2.2 Struktur kafein.....	15
Gambar 2.3 Bentuk kromatogram.....	23
Gambar 2.4 Diagram alat dan komponen KCKT.....	26
Gambar 3.1 Kerangka konseptual	45
Gambar 5.1 Kromatogram fase gerak	58
Gambar 5.2 Penentuan panjang gelombang maksimum kafein	61
Gambar 5.3 Spektrum panjang gelombang maksimum standar kafein.....	61
Gambar 5.4 Hasil replikasi uji selektivitas	63
Gambar 5.5 Kurva baku linieritas	67
Gambar 5.6 Kurva baku LOD & LOQ.....	68
Gambar 5.7 Kurva baku penetapan kadar	73
Gambar 6.1 Reaksi pelepasan kafein menjadi bentuk basa	75
Gambar 6.2 Struktur molekuler kafein, gugus kromofor & auksokrom	77

Daftar Lampiran

- Lampiran 1. Jadwal penyusunan naskah skripsi
- Lampiran 2. Penyiapan ekstrak
- Lampiran 3. Preparasi sampel
- Lampiran 4. Perhitungan V_{x0} Linieritas Standar Kafein
- Lampiran 5. Perhitungan LOD & LOQ
- Lampiran 6. Perhitungan penetapan kadar kafein

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Industri teh merupakan salah satu industri yang memiliki produk dengan daya tarik yang tinggi di beberapa negara. Perkebunan teh Wonosari merupakan perkebunan teh yang berada di bawah naungan PT. Perkebunan Nusantara XII (Persero) yang terletak di kota Lawang. Perkebunan teh ini, menghasilkan produk berupa teh hitam yang diekspor ke berbagai negara seperti Eropa, Australia, Amerika, Timur Tengah, dan Asia Tenggara (M. Januar, *et al.*, 2014). Selama periode tahun 2014-2018, teh Indonesia yang diekspor sebagian besar dalam bentuk teh hitam sekitar 80 persen. Tercatat pada tahun 2018 volume ekspor teh hitam mencapai 37.455 ton atau 79,97 persen terhadap total volume ekspor teh dengan nilai ekspor sebesar US\$ 73,3 juta (Badan Pusat Statistik, 2018).

Teh merupakan salah satu komoditas perkebunan yang penting dari beberapa komoditas pertanian yang ada di Indonesia. Teh sebagai salah satu komoditas yang bertahan hingga saat ini mampu memberikan kontribusi yang besar bagi perekonomian Indonesia melalui devisa yang dihasilkan dan pengembangan agroindustri. Perkebunan teh juga menjadi sektor usaha unggulan yang mampu menyerap tenaga kerja dalam jumlah yang besar. Selain itu tanaman teh juga menjaga kelestarian lingkungan sekitar dengan mengurangi resiko tanah longsor dan erosi tanah oleh air. Berdasarkan proses pengolahannya, jenis teh dapat dibedakan menjadi teh tanpa fermentasi (teh putih dan teh hijau), teh semi fermentasi (teh oolong), serta teh fermentasi (teh hitam) (Tugiyanti, 2017). Teh hitam yang dikenal dengan *Camellia sinesis* merupakan tanaman yang paling banyak dikonsumsi sebagai minuman. Sekitar 78% teh hitam dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia khususnya masyarakat Sulawesi Selatan. Teh hitam memiliki cita rasa khas dengan warna dan rasa yang tajam yang dihasilkan ketika proses fermentasi, akibat adanya proses oksidasi oleh enzim katekin atau disebut dengan *polyphenol* (Carlioni, P., *et al.*, 2013). Teh hitam adalah

teh yang telah mengalami proses oksidasi enzimatis atau proses pegeraman dalam pengolahannya (Badan Pusat Statistik, 2018).

Teh hitam, yaitu teh yang dibuat melalui oksidasi polifenol dalam daun segar dengan katalis polifenol oksidase atau disebut dengan fermentasi. Proses fermentasi ini menghasilkan teh yang berwarna kuat dan berasa tajam (Syah, 2006). Minum teh hitam adalah pilihan yang sangat baik jika anda mencari alternatif kopi atau minuman berenergi. Teh hitam tidak hanya minuman non-pemanis atau rendah kalori tetapi juga memberikan beberapa manfaat kesehatan dimana dapat memberikan perlindungan terhadap timbulnya beberapa gangguan kronis seperti diabetes, kanker paru, kanker prostat, kanker payudara, anti ulser, dan gangguan pernapasan (Melvia Sundalian, 2018). Penelitian Davies *et al* (2003) telah menunjukkan bahwa minum teh hitam secara teratur membantu mengurangi kemungkinan timbulnya gangguan kardiovaskular (Tea.G, 2017). Selain manfaat sebagai antioksidan, anti kanker, dan pencegahan arterosklerosis minum teh hitam juga memainkan peran kunci dalam mengurangi berat badan (Pan H, dkk., 2016). Greyling *et al* (2014) telah mengkaji dan menunjukkan manfaat yang sama dari minum teh hitam pada tekanan darah diantara orang dewasa normal. Selain itu, minum teh hitam secara teratur juga mengurangi risiko stroke (Larsson SC, dkk., 2013).

Berdasarkan uraian berbagai manfaat dari teh hitam di atas tidak terlepas dari adanya senyawa aktif yang terkandung dalam teh hitam. Teh hitam mengandung banyak sekali senyawa aktif sehingga dapat dimanfaatkan untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit kronis maupun non kronis. Kandungan kimianya, seperti kafein, teobromin, teofilin, tanin, adenin, minyak atsiri, polisakarida, asam amino, lipid, vitamin (seperti vitamin C), kuersetin, naringenin, dan polifenol (Scoparo, dkk., 2016). Komposisi kandungan kimia pada teh tergantung pada tempat tumbuh, tanah, ketinggian penanaman, pemetikan, sortasi, pengolahan, ekstraksi, pengeringan, dan penyimpanan (Ahmad, 2012). Terdapat

beberapa senyawa metabolit sekunder pada teh hitam yang menjadi perhatian khusus, mengingat kandungannya cukup tinggi, salah satunya adalah kafein (Scoparo, dkk., 2016).

Kafein merupakan senyawa alkaloid utama golongan metilxantin dengan kadar rata-rata pada teh hitam sebesar 1,5-5% (Engelhardt, 2010). Jumlah kandungan kafein dalam teh sangat tergantung dari jenis, proses pengolahan dan cara penyeduhannya. Namun, belum diketahui secara pasti waktu optimum yang diperlukan saat merendam teh (Kimia. J, 2015). Menurut Devi, D. *et al*(2015) semakin lama teh direndam maka kafein dalam teh akan semakin terekstrak dan terjadi oksidasi. Untuk mendapatkan teh yang lebih pekat dilakukan dengan menambahkan bubuk teh, bukan dengan memperpanjang waktu penyeduhan. Ketika proses penyeduhan teh maka terjadi proses ekstraksi yaitu kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang larut dengan pelarut cair.

Ekstraksi adalah metode yang digunakan untuk memisahkan senyawa organik dari campuran senyawa. Teknik ini secara selektif melarutkan satu atau lebih senyawa pada pelarut yang sesuai. Larutan dari senyawa terlarut ini disebut sebagai ekstrak (Chaugule, dkk., 2019). Menurut Student, P. G. (2017) meskipun air hampir selalu merupakan salah satu cairan pelarut dalam proses ekstraksi cair-cair, namun pilihan pelarut organik cukup luas.

Telah dilakukan penelitian ekstraksi kafein pada teh oleh beberapa peneliti. Chaugule dkk (2019) melakukan ekstraksi kafein menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan pelarut. Hasil ekstraksi kafein yang diperoleh sebanyak 6mg. Pradeep S (2015) juga melakukan metode ekstraksi cair-cair pada kafein dan mengatakan bahwa efisiensi ekstraksi kafein dari berbagai sumber dengan menggunakan kloroform lebih tinggi dari pelarut lainnya. Hasil ekstraksi kafein sebesar 0.167 g (167 mg).

Untuk analisis kandungan kafein di dalam produk teh hitam digunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik dengan detektor *Photodiode Array Detector* (PDA). Pemilihan detektor *Photodiode Array Detector* (PDA) karena dapat mendeteksi pada rentang panjang gelombang 200-800 nm secara bersamaan sehingga mampu menyajikan kromatogram dalam bentuk 3 dimensi, detektor ini juga dapat memberikan informasi kemurnian puncak kromatogram. Sementara itu, jika menggunakan detektor UV-Vis, maka ketidakmurnian puncak tidak dapat teramati (Sanjayadi, 2020). Sistem KCKT dipilih karena memiliki daya pisah yang baik, peka, kolom dapat dipakai kembali, dan dapat digunakan untuk menganalisis molekul yang besar dan kecil (Harmita, 2009). Analisis kafein dapat dilakukan menggunakan KCKT fase terbalik yang terdiri dari fase gerak bersifat lebih polar daripada fase diamnya (Kirkland, *et al.*, 2010). Sebelum dilakukan penetapan kadar kafein menggunakan metode KCKT fase terbalik, dilakukan validasi metode analisis terlebih dahulu. Validasi metode analisis menurut *United States Pharmacopeia* (USP) 2014 dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduksibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi masalah dalam analisis. Parameter analisis yang ditentukan pada validasi adalah akurasi, presisi, batas deteksi, batas kuantitasi, spesifikasi/selektivitas, linieritas dan rentang.

Sejauh ini belum ada peneliti yang melakukan validasi dan penetapan kadar pada senyawa utama golongan alkaloid yaitu kafein terutama pada produk teh hitam PTPN XII Lawang, Jawa Timur. Oleh karena itu, maka peneliti melakukan penelitian tentang validasi metode analisis dan penetapan kadar kafein pada produk teh hitam dengan menggunakan standar kafein. Dalam penelitian ini peneliti menggunakan metode *HighPerformance Liquid Chromatography* (HPLC) *Reversed Phase* atau dengan nama lain Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase

terbalik. Penelitian ini dilakukan guna untuk mengetahui kadar kafein yang terkandung dalam salah satu produk teh hitam yang berasal dari PT. Perkebunan Nusantara XII (Persero) yang terletak di kota Lawang.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kondisi optimum KCKT fase terbalik (laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang) pada sampel teh hitam dipasaran?
2. Apakah kondisi optimasi KCKT yang terpilih telah memenuhi persyaratan validasi untuk melakukan penetapan kadar kafein pada sampel teh hitam dipasaran?
3. Berapakah kadar kafein dalam produk teh hitam yang ditetapkan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi fasa terbalik?

1.3 Tujuan

1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar kafein dalam produk teh hitam yang dilakukan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik dan apakah data yang diperoleh dari hasil penetapan kadar kafein telah memenuhi persyaratan validasi metode analisis seperti linieritas, selektivitas, limit deteksi, limit kuantitasi, akurasi dan presisi.

2. Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui kondisi optimum KCKT fase terbalik yang meliputi laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang pada sampel teh hitam dipasaran.
- b. Untuk mendapatkan kondisi optimasi KCKT yang terpilih telah memenuhi persyaratan validasi untuk melakukan penetapan kadar kafein pada sampel teh hitam dipasaran.

- c. Untuk mengetahui kadar kafein dalam produk teh hitam yang ditetapkan dengan metode KCKT fase terbalik.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi kepada masyarakat kadar kafein khususnya pada teh bubuk hitam dari salah satu produk yang tersebar dipasaran.
2. Manfaat praktis dari penelitian ini adalah menambah bukti ilmiah tentang validasi metode analisis dan penetapan kadar kafein pada produk teh hitam.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Teh

2.1.1 Pengertian Teh

Teh adalah salah satu jenis minuman yang paling dikenal di dunia. Indonesia termasuk dalam 5 negara terbesar pengekspor teh selain India, China, Sri Lanka, dan Kenya. Produksi ekspor teh di Indonesia mencapai 6% dari total ekspor teh di dunia (Anonim, 2008). Teh sebagai salah satu komoditas yang bertahan hingga saat ini mampu memberikan kontribusi yang besar bagi perekonomian Indonesia melalui devisa yang dihasilkan dan pengembangan agroindustri. Perkebunan teh juga menjadi sektor usaha unggulan yang mampu menyerap tenaga kerja dalam jumlah yang besar. Selain itu tanaman teh juga menjaga kelestarian lingkungan sekitar dengan mengurangi resiko tanah longsor dan erosi tanah oleh air.

Hampir tiap negara memiliki teh dengan cara pembuatan, penyajian juga cita rasa yang berbeda. Di Indonesia, teh juga merupakan minuman yang banyak dikonsumsi sejak lama. Teh yang paling banyak ditemui dan sudah ada di Indonesia sejak lama adalah teh hitam (*black tea*), atau juga disebut teh tubruk. Teh banyak dikonsumsi karena selain rasanya yang khas, teh juga memiliki banyak khasiat (Juniaty, *et al.*, 2012).

Teh hitam adalah daun muda kering dari tanaman *Camellia sinensis* (Linne) O. Kuntze (Fam. Tehaceae) diolah menjadi minuman teh. Tanaman teh berasal dari kawasan India bagian Utara dan China Selatan. Ada dua kelompok varietas teh yang terkenal, yaitu varietas *Assamicay* yang berasal dari Assam dan varietas *Sinensis* yang berasal dari China. Tanaman teh umumnya ditanam di perkebunan, dan dipanen secara manual dan dapat tumbuh pada ketinggian 200-2300 meter diatas permukaan laut (Sudaryat, Y. *et al.*, 2015).

Sekitar 75% dari produksi teh di seluruh dunia adalah teh hitam. Teh hitam dikonsumsi oleh 87% peminum teh Amerika. Teh hitam merupakan jenis teh yang paling umum di Asia Selatan (India, Sri Lanka, Bangladesh) dan sebagian besar negara-negara di Afrika, seperti di Kenya, Burundi, Rwanda, Malawi, dan Zimbabwe (Sudaryat, Y. *et al.*, 2015). Cara pengolahan teh hitam melalui tahap-tahap seperti pelayuan, penggulungan, oksidasi polifenol, pengeringan dan sortasi (Hartoyo, 2003). Pada proses sortasi kering, teh kering dipisahkan menjadi beberapa jenis mutu yang sesuai dengan standar perdagangan teh. Setiap *grade* mempunyai standar ukuran yang berbeda berdasarkan besar kecil partikel sesuai dengan standar yang ditentukan (Sudaryat, Y. *et al.*, 2015).



Gambar 2.1 Daun Teh

Sumber : Javagreentea.com

Secara taksonomi, tanaman teh menurut Widyaningrum (2013) diklasifikasikan sebagai berikut:

- Divisi : *Spermatophyta*
- Sub divisi : *Angiospermae*
- Kelas : *Dicotyledoneae*
- Sub kelas : *Dialypetalae*
- Ordo : *Guttiferales (Clusiales)*

Familia : *Camelliaceae (Theaceae)*
Genus : *Camellia*
Spesies : *Camellia sinensis*
Varietas : *Assamica*

Camellia sinensis berasal dari Asia Selatan dan Tenggara, namun sekarang telah dibudidayakan di seluruh dunia, baik daerah tropis maupun subtropis. Tumbuhan ini merupakan perdu atau pohon kecil yang biasanya dipangkas bila dibudidayakan untuk dipanen daunnya. Ia memiliki akar tunggang yang kuat. Bunganya kuning-putih berdiameter 2,5-4 cm dengan 7 hingga 8 petal. Biji *Camellia sinensis* serta biji daunnya memiliki panjang 4-15 cm dan lebar 2-5 cm. Daun segar mengandung kafein sekitar 4% (Eunike, 2010). Daun teh memiliki morfologi sebagai berikut:

- a. Daun teh memiliki bau khas aromatik.
- b. Daun teh memiliki helai-helai daun yang cukup tebal, kaku, berbentuk melebar sampai memanjang, panjang daunnya tidak lebih dari 5 cm, dan bertangkai pendek.
- c. Permukaan daun teh bagian atas mengkilat, dan pada daun muda permukaan bawahnya berambut dan jika telah tua menjadi licin.
- d. Tepi daun teh bergerigi, agak tergulung ke arah bawah (Kartasapoetra, 1992).

2.1.2 Klasifikasi Teh

Berdasarkan proses pengolahannya, jenis teh dapat dibedakan menjadi teh tanpa fermentasi (teh putih dan teh hijau), teh semi fermentasi (teh oolong), serta teh fermentasi (teh hitam) (Rohdiana, 2015). Menurut Trease and Evas (2002) teh mengandung kafein 1-5% dan 10-24% tanin, serta teobromin, teofilin, dan minyak atsiri dalam jumlah kecil. Teh yang banyak beredar di Indonesia menurut cara pengolahannya dapat dibedakan menjadi:

1. Teh hijau, yaitu teh yang dibuat melalui inaktivasi enzim polifenol oksidase di dalam daun teh segar. Metode inaktivasi enzim polifenol oksidase teh hijau dapat dilakukan melalui pemanasan (udara panas) dan penguapan (*steam*/uap air).
2. Teh oolong (semifermentasi), yaitu teh yang diproses melalui pemanasan daun dalam waktu singkat setelah penggulungan. Oksidasi terhenti dalam proses pemanasan, sehingga teh oolong disebut dengan teh semifermentasi. Karakteristik teh oolong berada di antara teh hijau dan teh hitam.
3. Teh hitam, yaitu teh yang dibuat melalui oksidasi polifenol dalam daun segar dengan katalis polifenol oksidase atau disebut dengan fermentasi. Proses fermentasi ini menghasilkan teh yang berwarna kuat dan berasa tajam (Syah, 2006).

2.1.3 Manfaat Teh

Semakin lama teh diseduh akan membuat kadar kafeinnya semakin tinggi. Masing-masing jenis teh memiliki waktu yang berbeda saat diseduh. Untuk mendapatkan khasiat teh, sebaiknya teh diseduh tidak lebih dari tiga menit sebelum diminum. Kebiasaan masyarakat dalam menyeduh teh dengan merendam ampas teh dalam teko atau cangkir dalam waktu yang cukup lama. Bahkan beberapa orang diantaranya ada yang memiliki kebiasaan merendam teh semalaman untuk diminum keesokan harinya. Sebaiknya waktu yang digunakan dalam menyeduh teh tidak terlalu lama, karena dapat membuat senyawa yang bermanfaat di dalam teh mati.

Minum teh hitam adalah pilihan yang sangat baik jika anda mencari alternatif kopi atau minuman berenergi. Teh hitam tidak hanya minuman non-pemanis atau rendah kalori tetapi juga memberikan beberapa manfaat kesehatan dimana dapat memberikan perlindungan terhadap timbulnya beberapa gangguan kronis. Baru-baru ini, Rasheed (2019) telah mengkaji manfaat kesehatan dari teh hitam. Dalam ulasannya yang sangat bagus, dia menyebutkan bahwa minum teh hitam memiliki berbagai manfaat kesehatan

karena mengandung banyak antioksidan kuat dan senyawa lain yang berpotensi mengurangi peradangan dan mengurangi risiko timbulnya kondisi kronis.

Penelitian telah menunjukkan bahwa minum teh hitam secara teratur membantu mengurangi kemungkinan timbulnya gangguan kardiovaskular (Bahorun. T, 2012). Selain manfaat ini, minum teh hitam juga memainkan peran kunci dalam mengurangi berat badan (Pan H, dkk., 2016). Greyling *et al* (2014) telah mengkaji dan menunjukkan manfaat yang sama dari minum teh hitam pada tekanan darah di antara orang dewasa normal. Dalam pandangan temuan ini, disarankan minum teh hitam membantu kita mengurangi risiko komplikasi yang mematikan ini terkait dengan hipertensi. Selain itu, minum teh hitam secara teratur juga mengurangi risiko *stroke* (Larsson SC, dkk., 2013).

2.1.4 Kandungan Teh

Berdasarkan uraian berbagai manfaat dari teh hitam di atas tidak terlepas dari adanya senyawa aktif yang terkandung dalam teh hitam. Teh hitam mengandung banyak sekali senyawa aktif sehingga dapat dimanfaatkan untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit kronis maupun non kronis. Berdasarkan penelitian Juniaty, *et al* (2012) teh memiliki kandungan yaitu kafein dan beberapa jenis antioksidan. Kandungan kafein dalam teh sekitar seperdelapan hingga sepertiga dari kopi hitam. Kandungan kimianya lainnya seperti: teobromin, teofilin, tanin, adenin, minyak atsiri, polisakarida, asam amino, lipid, vitamin (seperti vitamin C), kuersetin, naringenin, dan polifenol (Scoparo, dkk., 2016). Berdasarkan proses pengolahannya terdapat beberapa jenis teh salah satunya teh hitam. Teh hitam adalah jenis teh yang dibuat melalui proses pelayuan, penggilingan, oksimatis dan pengeringan. Teh hitam memiliki kandungan kafein yang lebih tinggi dibandingkan teh hijau (Rohdiana, 2015).

Keberadaan alkaloid biasanya sebagai garam organik dalam tumbuhan dalam bentuk senyawa padat berbentuk kristal dan kebanyakan berwarna. Pada daun atau buah segar biasanya keberadaan memberikan rasa pahit (Udayana, 2019).

Daun teh memiliki kandungan zat kimia yang dapat digolongkan menjadi empat kelompok, yaitu senyawa fenol (polifenol, flavanol), senyawa bukan fenol (karbohidrat, pektin, alkaloid, protein, dan asam amino, klorofil, asam organik, resin, vitamin, dan mineral), enzim dan senyawa aromatis (Widyaningrum, 2013).

1. Senyawa Fenol

a. Polifenol

Polifenol merupakan senyawa yang paling umum dan banyak ditemukan pada bunga, dan buah-buahan (Cristian, 2017). Di dalam kandungan fenol terdapat senyawa flavonoid, lignin, tannin, camarin, dll (Society, 2016).

b. Flavanol

Flavanol merupakan antioksidan alami yang terdapat dalam tanaman pangan dan memiliki kemampuan untuk mengikat logam. flavanol yang terdapat pada teh diantaranya adalah kaemferol, kuersetin, dan mirisetin (Cushnie, 2005).

2. Senyawa Bukan Fenol

a. Karbohidrat

Pada daun teh terdapat karbohidrat yang meliputi sukrosa, glukosa, dan fruktosa. Peranan karbohidrat pada pengolahan teh yaitu bereaksi dengan asam-asam amino dan polifenol sehingga pada suhu yang tinggi akan membentuk senyawa aldehid yang nantinya akan menyebabkan timbulnya aroma (Juniaty, *et al.*, 2012).

b. Pektin

Saat pengolahan teh, pektin terurai menjadi asam pektat dan metil alkohol, dan sebagian dari metil alkohol akan menguap ke udara dan

sebagian lainnya bereaksi dengan asam-asam organik menjadi ester yang menyusun aroma (Juniaty, *et al.*, 2012).

c. Alkaloid

Seduhan teh memiliki sifat yang menyegarkan, sifat menyegarkan dari teh ini berasal dari senyawa alkaloid yang ada di dalam daun teh. Senyawa-senyawa utama yang terdapat dalam senyawa alkaloid daun teh adalah kafein, *theobromine*, dan *theofoline* (Juniaty, *et al.*, 2012).

d. Protein dan asam amino

Kandungan protein dalam daun teh berperan dalam pembentukan aroma. Pada proses pelayuan terjadi penguraian protein menjadi asam-asam amino. Kandungan protein dan asam amino pada daun teh sekitar 1,4-5% dari berat kering daun (Juniaty, *et al.*, 2012).

e. Klorofil dan zat warna yang lain

Klorofil sangat berperan dalam pemberian warna hijau, karena salah satu unsur penentu kualitas dari teh yaitu dari warnanya. Kandungan zat warna yang terdapat dalam daun teh sekitar 0,019% dari berat kering daun (Juniaty, *et al.*, 2012).

f. Asam Organik

Asam organik yang terkandung dalam daun teh yaitu asam sitrat, asam malat, asam suksinat, dan asam oksalat. Kandungan asam organik dalam daun teh yaitu sekitar 0,5-2% dari berat daun kering. Asam organik dapat menyebabkan aroma yang enak karena dalam proses pengolahannya asam organik bereaksi dengan metil alkohol membentuk senyawa ester (Juniaty, *et al.*, 2012).

g. Senyawa Aromatis

Aroma merupakan hal penting sebagai salah satu penentu kualitas teh. Aroma tersebut di dapat dari substansi aromatis yang terkandung dalam daun teh. Substansi aromatis pembentuk aroma merupakan senyawa yang mudah menguap baik pada daun teh maupun dari teh yang terbentuk sebagai hasil reaksi biokimia pada proses pengolahan teh. Substansi aromatis yang terkandung pada daun teh yang masih alami

(belum dalam proses pengolahan) jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan yang terbentuk pada saat proses pengolahan teh (Juniaty, *et al.*, 2012).

h. Enzim

Enzim yang terkandung dalam daun teh berperan sebagai biokatalisator yang artinya senyawa tersebut mempercepat reaksi kimia, namun zat itu sendiri tidak ikut bereaksi, beberapa enzim yang terdapat dalam daun teh diantaranya adalah invertase, amilase, beta glukosidase, oksimatiase, protease, dan peroksidase. Selain itu, terdapat enzim yang berperan dalam proses pengolahan teh pada proses oksidasi ketekin yaitu enzim polifenol oksidase (Juniaty, *et al.*, 2012).

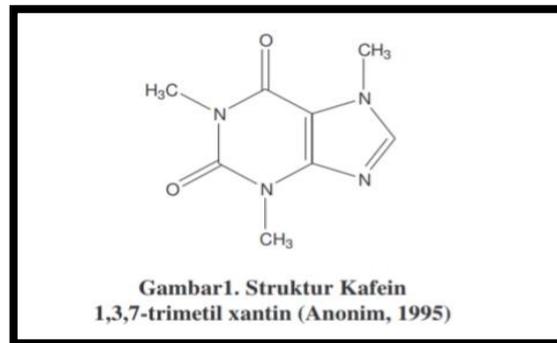
2.2 Senyawa Kafein

Senyawa kafein merupakan sejenis alkaloid heterosiklik dalam golongan *methylxantin*, yang menurut definisi berarti senyawa organik yang mengandung nitrogen dengan struktur dua cincin atau dua siklik. Molekul ini secara alamiah terjadi pada tanaman sebagai metabolit sekunder. Fungsinya dalam tumbuhan adalah sebagai pestisida alami yang melumpuhkan dan membunuh serangga yang memakan tumbuhan tersebut. Zat ini dihasilkan secara khusus dalam daun, kacang-kacangan dan buah-buahan lebih dari 60 tanaman, termasuk daun teh biasa (*Camellia sinensis*), kacang cola (*Cola acuminata*), kopi (*Coffea arabika*), kacang koko. Kafein memiliki efek farmakologis yang bermanfaat secara klinis, seperti menstimulan susunan syaraf pusat, relaksasi otot terutama otot polos bronkus dan stimulan otot jantung (Maramis, 2013).

2.2.1 Struktur Kafein

Kafein atau nama kimianya 1,3,7-trimetil xantin memiliki rumus molekul $C_8H_{10}N_4O_2$ memiliki massa molar 194,19 gram/mol, mudah larut

dalam air, dalam banyak pelarut organik dan meleleh pada suhu 234°C-239°C (Muhamad, 2017) serta memiliki struktur seperti pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur Kafein

2.2.2 Sifat Fisika Kimia Kafein

Pemerian kafein berupa hablur bentuk jarum halus, mengkilat, tidak berwarna, rasa pahit, tidak berbau, larutan bersifat netral terhadap kertas lakmus. Kafein agak sukar larut dalam air, karena kelarutan kafein dalam air adalah 22mg / ml pada 25 ° C, 180 mg / ml pada 80 ° C, dan 670 mg / ml pada 100°C, sehingga kafein lebih larut dalam diklorometana (140 mg / ml) daripada dalam air (22 mg / ml) (Chaugule, dkk., 2019). Kafein juga agak sukar larut dalam etanol, mudah larut dalam kloroform dan sukar larut dalam eter. Lebih larut dalam asam encer (Clarke, 1996). Titik lebur kafein 235°C dan 275°C. Dosis maksimal kafein adalah 500 mg untuk sekali pemakaian dan 1,5 gram untuk satu hari pemakaian (Anonim, 1995). Penyimpanan kafein, simpan kafein hidrat dalam wadah tertutup rapat dan kafein anhidrat dalam wadah tertutup baik (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2014).

2.2.3 Mekanisme Kerja Kafein

Hingga saat ini, telah diketahui satu-satunya mekanisme yang dipengaruhi oleh kafein pada konsentrasi mendekati normal tingkat fisiologis, dalam kisaran μm , adalah modulasi reseptor adenosin (Chen,*et*

al., 2001). Namun, mekanisme lain, seperti aktivasi reseptor *ryanodine* dan penghambatan fosfodiesterase, yang juga telah terbukti dipengaruhi oleh kafein dan turunannya, terjadi pada konsentrasi kafein tinggi, dalam kisaran plasma beracun level (dalam kisaran mm) (Kolahdouzan and Hamadeh, 2017).

Mekanisme kerja kafein adalah menyekat reseptor adenosin, menghambat enzim fosfodiesterase, dan menginduksi translokasi kalsium intraseluler. Adenosin menyebabkan bronkokonstriksi, menghambat pelepasan renin, dan mengurangi agregasi trombosit. Karena strukturnya mirip, maka kafein akan menggantikan posisi adenosin untuk berikatan dengan reseptor di otak. Adenosin sendiri merupakan neurotransmitter di otak yang menekan aktivitas sistem saraf pusat (neuro-depresan). Bagaimana kafein bisa meningkatkan aktivitas dari SSP masih belum bisa diketahui secara pasti, namun efek dari kafein ini bisa menyebabkan peningkatan aktivitas mental dan membuat seseorang tetap terjaga. Adenosin juga berperan dalam pembentukan asam nukleat dari ATP (Orru M, dkk., 2015).

Kafein juga dapat meningkatkan hormon adrenalin dalam darah sehingga menyebabkan peningkatan dari aktivitas otot jantung dalam memompa darah dan meningkatkan tekanan darah, akibatnya aliran darah ke berbagai organ tubuh juga meningkat. Mekanisme inilah yang mendasari perasaan segar atau hilangnya rasa lelah setelah mengkonsumsi kafein. Tetapi harus diingat bahwa efek ini hanyalah bersifat sementara (Maughan, 2003). Selain bekerja pada reseptor adenosin, kafein juga menstimulasi pelepasan norepinefrin, menghambat pemecahan cAMP, meningkatkan kerja cGMP, dan meningkatkan efek dopamin *post sinaps*. Kafein juga berpengaruh terhadap reseptor GABA dan serotonin (Orru M, dkk., 2015).

2.3 Tinjauan tentang Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain. Senyawa aktif yang terdapat dalam simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat, dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Rondang Tambun, dkk., 2016).

Proses pembuatan ekstrak diawali dari pembuatan serbuk simplisia kering (penyerbukan) yang memiliki derajat kehalusan tertentu. Semakin halus serbuk simplisia, maka proses ekstraksi yang terjadi semakin efektif, namun semakin halus serbuk simplisia yang diekstraksi menyebabkan semakin sulit proses penyaringan yang diperlukan (Depkes RI, 2000).

Abidi, dkk (2020) melakukan ekstraksi kafein dari 5 macam sampel minuman dipasaran yaitu salah satunya teh hitam. Peneliti melakukan ekstraksi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan pelarut kloroform, dan mendapatkan hasil ekstraksi kafein pada teh hitam sebesar 1,1% dimana hasil ekstraksi tertinggi kedua setelah kafein yang terkandung pada minuman kopi. Berdasarkan hasil tinjauan di atas, pada penelitian ini metode ekstraksi yang dipilih adalah metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut kloroform. Pemilihan metode dan pelarut ini dikuatkan oleh pernyataan dari PT. SUN, dkk (2014) bahwa tingginya tingkat pemisahan kafein oleh kloroform dinilai sangat efisien dengan rentang sekitar dua kali lebih besar dari air dalam hal laju alir pelarut yang digunakan untuk uji. Sehingga kafein dalam sampel teh hitam dapat terekstraksi dengan baik.

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif. Pelarut ekstraksi yang baik membutuhkan lima fitur penting yaitu tidak bisa bercampur dengan pelarut lain (biasanya air), memiliki titik didih yang relatif rendah sehingga mudah dikeluarkan dari senyawa setelah ekstraksi, ekstrak sedikit atau tidak ada kotoran dan senyawa lain di dalam campuran, tidak beracun, tidak reaktif, tersedia dan murah, dan memiliki kelarutan tinggi untuk senyawa organik. Dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan (Depkes RI, 2000). Berbagai macam metode ekstraksi yang biasa dilakukan adalah :

1. Cara dingin

- a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstraksian simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu (terus-menerus). Remaserasi yang berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes RI, 2000).

- b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus-menerus sampaidiperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Depkes RI, 2000).

2. Cara panas

a. *Reflux*

Reflux adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilanjutkan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Departemen Kesehatan RI, 2000).

b. *Soxhlet*

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Departemen Kesehatan RI, 2000).

c. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur 96-98°C selama waktu tertentu 15-20 menit) (Departemen Kesehatan RI, 2000).

d. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinyu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar) yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C (Departemen Kesehatan RI, 2000).

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (lebih dari 30 menit) dan temperatur sampai titik didih air (Departemen Kesehatan RI, 2000).

3. Destilasi uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan yang mudah menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwatekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinyu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian (Departemen Kesehatan RI, 2000).

4. Cara ekstraksi lainnya

a. Ekstraksi ultrasonik (Sonikasi)

Metode ini adalah metode ekstraksi dengan menggunakan gelombang ultrasonik (getaran ultrasonik >20.000 Hz) yang memberikan efek terhadap ekstraksi dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (*cavitation*) sebagai stress dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonik (Departemen Kesehatan RI, 2000).

b. Ekstraksi berkesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi (Departemen Kesehatan RI, 2000).

c. Superkritikal karbondioksida

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk dengan simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel tekanan dan temperatur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan

senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak (Departemen Kesehatan RI, 2000).

2.3.1 Tinjauan tentang ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 1995).

Ekstrak cair adalah sediaan simplisia nabati yang mengandung etanol sebagai pelarut atau sebagai pengawet. Jika tidak dinyatakan lain pada masing-masing monografi tiap ml ekstrak mengandung senyawa aktif dari 1 gram simplisia yang memenuhi syarat. Ekstrak cair yang cenderung membentuk endapan dapat didiamkan dan disaring atau bagian yang bening di enap tuangkan (dekantasi). Beningan yang diperoleh memenuhi syarat Farmakope. Ekstrak cair dapat dibuat dari ekstrak yang sesuai (Depkes RI, 1995).

2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

1. Pengertian : Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang juga dikenal sebagai Kromatografi Cair Tekanan Tinggi ini merupakan teknik analisis untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan kuantifikasi masing-masing unsur campuran (Babu. A, 2017).
2. Prinsip : Cuplikan atau sampel diinjeksikan ke dalam aliran fasa gerak. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen cairan. Solut-solut yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom terlebih dahulu dan sebaliknya. Setiap komponen campuran yang keluar dari kolom di deteksi oleh detektor dan memberikan signal yang akan diproses oleh recorder dalam bentuk kromatogram (Syarif, 2014).

3. Ruang lingkup : Digunakan diberbagai bidang seperti di bidang farmasi, biokimia, produk makanan, bahan kimia industri, kimia forensik, bidang lingkungan, obat klinis untuk analisis campuran khas seperti antibiotik, asam amino, asam lemak, obat-obatan, racun, ion anorganik, ekstrak urin, estrogen (Lipka, *et al.*, 2015).
4. Keuntungan : Memiliki resolusi tinggi, sensitivitas tinggi, reproduibel yang baik, ukuran sampel kecil, kondisi analisis moderat, tidak perlu menguapkan sampel seperti dalam gas kromatografi, sampel mudah difraksinasi dan dimurnikan (Malviya, *et al.*, 2015).
5. Bagian-bagian instrumen : Terdiri dari wadah fase gerak, sistem penghantaran fase gerak atau alat untuk memasukkan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung, dan suatu komputer atau integrator atau perekam (Gandjar, dkk., 2012).
6. Tipe KCKT : Berdasarkan metode pemisahan terdiri dari kromatografi fase normal, kromatografi fase terbalik, kromatografi penukar ion, dan kromatografi permeasi gel. Berdasarkan teknik elusi terbagi atas elusi isokratik dan elusi gradien. Berdasarkan jenis analisisnya kromatografi terdiri dari analisis kualitatif dan analisis kuantitatif.

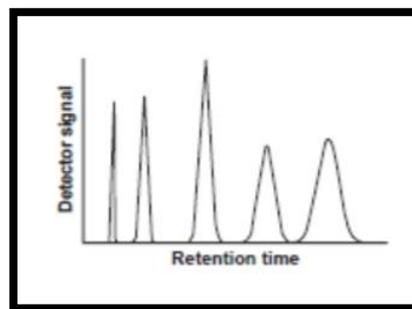
2.4.1 Pengertian Kromatografi

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) adalah teknik pemisahan yang diterima secara luas yang digunakan untuk analisis bahan obat, baik dalam *bulk* atau dalam sediaan farmasetik, serta dalam cairan biologis. KCKT dapat digunakan baik untuk analisis secara kualitatif maupun kuantitatif (Rohman, 2009).

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan hasil pengembangan kromatografi cair, yakni kromatografi cair kolom. Teknologi kolom didasarkan atas penggunaan kolom berlubang kecil (diameter antara 2 μm sampai 5 μm) dan isi kolom berupa partikel kecil (3 μm sampai 5 μm) yang memungkinkan tercapainya keseimbangan secara cepat antara fasegerak dan

fase diam. Adanya sistem pompa yang memberikan tekanan tinggi kepada fasa gerak membuat tercapainya laju aliran hingga beberapa mL per menit, sehingga dinamakan kromatografi cair kinerja tinggi (Putra, 2004).

KCKT ini tergolong dalam kromatografi kolom, sebagaimana kromatografi kolom lainnya sampel yang melalui kolom akan mengalami pemisahan senyawa-senyawa di dalamnya. Jika kekuatan interaksi masing-masing senyawa berbeda-beda maka senyawa-senyawa tersebut akan terpisah menjadi puncak-puncak tersendiri. Progres dari pemisahan kromatografi ini akan dimonitor oleh suatu detektor yang sesuai yang terletak pada ujung kolom. Hasil yang diperoleh akan berbentuk suatu kromatogram yang terdiri atas puncak untuk masing-masing senyawa yang terpisah (Harvey, 2000).



Gambar 2.3 Bentuk Kromatogram

Teori mengenai KCKT dapat dibagi menjadi 2 aspek yaitu aspek kinetik dan aspek termodinamik. Aspek kinetik dari KCKT bertanggung jawab atas pelebaran kromatogram, sedangkan aspek termodinamik mempengaruhi waktu retensi analit dalam kolom. Bila dilihat dari segi analisis, faktor kinetik mempengaruhi lebar dari puncak kromatogram (efisiensi), sedangkan faktor termodinamik akan mempengaruhi letak puncak pada kromatogram (selektivitas) (Kazakevich dan Lo Brutto, 2007).

Pemisahan pada KCKT yang paling banyak digunakan adalah tipe kromatografi partisi dimana pemisahannya berdasarkan perbedaan partisi

analit dalam fase gerak dan fase diam cair yang tidak bercampur yang terikat pada penyangga kolom (Putra, 2004).

2.4.2 Prinsip Kerja Kromatografi

Prinsip kerja KCKT adalah fasa gerak cair dialirkan dengan bantuan pompa melalui kolom ke detektor. Cuplikan dimasukkan ke dalam aliran fasa gerak dengan cara penyuntikan. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen cairan. Karena perbedaan kekuatan interaksi antara solut-solut terhadap fasa diam. Solut-solut yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom terlebih dahulu dan sebaliknya. Setiap komponen campuran yang keluar dari kolom di deteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram. Jumlah *peak* menyatakan jumlah komponen, sedangkan luas *peak* menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran (Syarif, 2014).

2.4.3 Ruang Lingkup KCKT

KCKT digunakan diberbagai bidang seperti di bidang farmasi, biokimia, produk makanan, bahan kimia industri, kimia forensik, bidang lingkungan, obat klinis untuk analisis campuran khas seperti antibiotik, asam amino, asam lemak, obat-obatan, racun, ion anorganik, ekstrak urin, estrogen (Lipka, *et al.*, 2015).

Sedangkan menurut Vare, S.R (2016) KCKT memiliki beberapa aplikasi dibidang farmasi, forensik, lingkungan, dan klinis serta membantu dalam pemisahan dan pemurnian senyawa. Berikut pengaplikasian penggunaan metode KCKT:

1. Aplikasi Farmasi: Aplikasi farmasi meliputi pengendalian stabilitas obat, uji disolusi dan kontrol kualitas.
2. Aplikasi Lingkungan: Pemantauan polutan dan mendeteksi komponen air minum.

3. Aplikasi Forensik: Analisis pewarna tekstil, kuantifikasi obat dan steroid dalam sampel biologis.
4. Aplikasi Makanan dan Rasa: Analisis gula dalam jus buah, mendeteksi senyawa polisiklik dalam sayuran, analisis bahan pengawet.
5. Aplikasi Klinis: Mendeteksi neuropeptida endogen, analisis sampel biologis seperti darah dan air seni.

2.4.4 Keuntungan KCKT

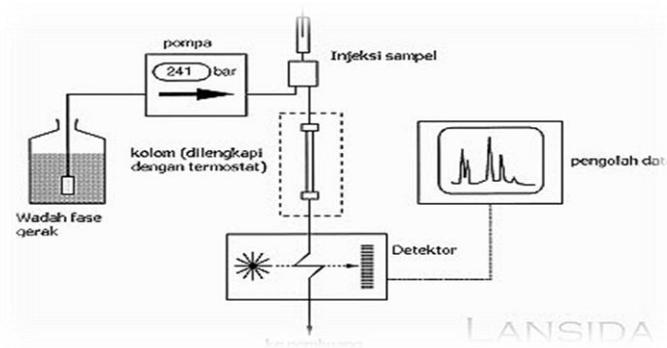
Penggunaan KCKT meningkat dari hari ke hari di seluruh dunia karena sifatnya yang unik seperti resolusi tinggi, sensitivitas tinggi (ppm-ppb), pengulangan yang baik, ukuran sampel kecil, kondisi analisis moderat, tidak perlu menguapkan sampel seperti dalam gas kromatografi, sampel mudah difraksinasi dan dimurnikan (Malviya, *et al.*, 2010).

Keuntungan analisis menggunakan KCKT adalah membutuhkan waktu analisis yang relatif cepat, daya pisah baik, sensitif hingga kadar nanogram/mililiter, pemilihan kolom dan eluen bervariasi, kolom dapat dipakai kembali, dapat digunakan untuk menganalisis senyawa dengan molekul besar dan kecil, dapat menganalisis sampel yang termolabil karena dilakukan pada suhu kamar, dan dapat menganalisa campuran yang mempunyai titik didih sangat tinggi (Harmita, 2004).

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis; analisis ketidakmurnian (*impurities*); analisis senyawa-senyawa tidak mudah menguap (non-volatil); penentuan molekul-molekul netral, ionik maupun *zwitter ion*, isolasi dan pemurnian senyawa; pemisahan senyawa-senyawa yang strukturnya hampir sama; pemisahan senyawa-senyawa dalam jumlah sekelumit (*trace element*), dalam jumlah banyak, dan dalam skala proses industri. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kuantitatif dan kualitatif. Kromatografi merupakan teknik yang mana solut atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi,

dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solut-solut ini diatur oleh distribusi solut dalam fase gerak dan fase diam (Gandjar, dkk., 2012).

2.4.5 Bagian-bagian dalam Kromatografi



Gambar 2.4 Diagram Alat dan Komponen KCKT

Sumber : Lansida.com

Instrumen KCKT pada dasarnya terdiri atas delapan komponen pokok yaitu wadah fase gerak, sistem penghantaran fase gerak atau alat untuk memasukkan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fasa gerak, tabung penghubung, dan suatu komputer atau integrator atau perekam (Gandjar, dkk., 2012).

a. Wadah Fase Gerak

Wadah fase gerak harus bersih dan lembam (*inert*). Wadah pelarut kosong ataupun labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Wadah ini biasanya dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan *degassing* (penghilangan gas) yang ada pada fasa gerak, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis (Gandjar, dkk., 2012).

b. Fase Gerak

Fase gerak merupakan pelarut atau campuran pelarut seperti tertera dalam masing-masing monografi (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2014). Fase gerak KCKT berupa zat cair, disebut juga *eluent* atau pelarut. Fase gerak berfungsi membawa komponen-komponen campuran menuju detektor, fase gerak dapat berinteraksi dengan solut-solut. Oleh karena itu fase gerak dalam KCKT merupakan salah satu faktor penentuan keberhasilan proses pemisahan (Syarif, 2014). Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi (Gandjar, dkk., 2012).

Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik (komponen fase gerak tetap sama selama elusi) atau dengan cara bergradien (komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi). Elusi bergradien digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang luas. Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan *buffer* dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk pemisahan dengan fase normal, fase gerak yang paling sering digunakan adalah campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan pelarut yang terklorisasi atau menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol (Gandjar, dkk., 2012).

Pemilihan fase gerak dapat ditentukan melalui eksperimen *trial and error* hingga didapatkan kromatogram yang diinginkan. Pada kromatografi fase terbalik, fase gerak bersifat polar dan akan terelusi lebih dulu. Sedangkan pada fase normal fase gerak bersifat kurang polar dan akan terelusi lebih dulu (Dong, 2006 ; Putra, 2004).

c. Pompa

Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat sebagaimana syarat wadah pelarut, yakni pompa harus *inert* terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit (Gandjar, dkk., 2012).

Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan (Gandjar, dkk., 2012).

d. *Injector*

Injektor untuk kerangka HPLC harus memberikan infus spesimen cairan di dalam lingkup 0,1 mL hingga 100 mL volume dengan reproduksibilitas tinggi dan dibawah tekanan tinggi (hingga 4000 psi) (Yogesh Kumar, *et al.*, 2018).

e. Kolom

Fase diam pada kolom KCKT *modern* umumnya menggunakan fase organik yang terikat secara kimia dengan silika atau bahan lain. Fase diam yang digunakan pada KCKT fase normal adalah bersifat polar, sedangkan fase gerak yang digunakan bersifat nonpolar. KCKT fase terbalik menggunakan fase diam yang bersifat nonpolar dan fase geraknya bersifat polar (Yogesh Kumar, *et al.*, 2018).

Fasediam yang umumnya digunakan adalah silika yang dimodifikasi atau butiran polimerik. Butiran dibuat dengan penambahan

hidrokarbon rantai panjang (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2014).

Oktadesil silika (ODS atau C18) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi. Oktil atau rantai alkil yang lebih pendek lagi lebih sesuai untuk solut yang polar. Silika-silika aminopropil dan sianopropil (nitril) lebih cocok sebagai pengganti silika yang tidak dimodifikasi. Silika yang tidak dimodifikasi akan memberikan waktu retensi yang bervariasi disebabkan karena adanya kandungan air yang digunakan (Gandjar, dkk., 2012).

Menurut Putra (2004) pemisahan sampel dari komponen-komponen lainnya terjadi di dalam kolom, oleh karena itu kolom mempunyai peranan yang sangat penting pada KCKT. Spesifikasi kolom yang biasa digunakan untuk pemisahan analitik yaitu yang berdiameter 2–4mm.

f. Detektor

Suatu detektor dibutuhkan pada KCKT untuk mendeteksi adanya komponen analit (analisis kualitatif) yang berhasil elusi dari dalam kolom dan menentukan kadar suatu sampel (analisis kuantitatif) (Seger, *et al.*, 2013).

Detektor yang ideal harus sensitif terhadap seluruh *peak* yang tereluasi, tidak dipengaruhi perubahan suhu dan komposisi fase gerak pada eluasi gradien, dapat memonitor sampel dalam jumlah kecil, tidak berkontribusi pada pelebaran puncak, bereaksi cepat, dapat diatur, dan murah. Beberapa jenis detektor KCKT yaitu UV-Vis, *photodiode array detector*, *detector*, *fluorescence detector*, *conductivity detector*, *refraktifindex*,

EvaporativeLightScattering(ELSD), *electrochemicaldetector* dan *mass spectrometrydetector*(Suprianto, 2014).

g. Perangkat Pengumpulan Data atau Integrator

Sinyal dari detektor dapat dikumpulkan pada perekam grafik atau integrator elektronik yang berfluktuasi dalam kualitas banyak sisi dan dalam kapasitasnya untuk memproses, menyimpan dan memproses kembali informasi kromatografi. PC mengoordinasikan reaksi indikator untuk setiap bagian dan menempatkannya ke dalam kromatografi (Malviya, R., *et al.*, 2010).

2.4.6 Tipe-tipe KCKT

A. Berdasarkan Metode Pemisahan

1. Kromatografi fase normal

Dalam metode ini, pemisahan didasarkan pada polaritas. Pengembang pertama menggunakan CaCO_3 sebagai kolom pemisahan dan petroleum eter sebagai pelarut berkembang. Kombinasi fase diam dan fase gerak disebut kromatografi fase normal. Fase diam adalah polar, seperti jenis silika gel, sianotipe, tipe amino dan fase gerak adalah non polar misalnya pelarut organik, heksana, benzena (Lababidi, *et al.*, 2014)

2. Kromatografi fase terbalik

Merupakan kebalikan dari kromatografi fase normal dimana fase diam adalah non polar dan fase gerak adalah polar. Contoh fase gerak adalah pelarut organik (metanol, asetonitril), daptar (daptar fosfat) (Fangfang, *et al.*, 2014).

3. Kromatografi penukar ion

Kromatografi penukar ion adalah proses yang memungkinkan pemisahan ion dan molekul polar berdasarkan muatannya. Ini dapat

digunakan untuk hampir semua jenis molekul termasuk protein besar, nukleotida kecil dan asam amino. Fase gerak yang digunakan berupa ion dan dapar sedangkan fase diam yang digunakan yaitu penukar ion (Malviya, R., *et al.*, 2010).

4. Kromatografi permeasi gel

Kromatografi jenis ini tidak memiliki interaksi yang menarik antara fase diam dan zat terlarut. Fase cair atau gas melewati gel berpori yang memisahkan molekul sesuai dengan ukurannya. Pori-pori biasanya kecil dan mengeluarkan molekul terlarut yang lebih besar, tetapi memungkinkan molekul yang lebih kecil untuk memasuki gel, menyebabkan mereka mengalir melalui volume yang lebih besar. Ini menyebabkan molekul yang lebih besar melewati kolom pada kecepatan yang lebih cepat daripada yang lebih kecil (O'Fagain, *et al.*, 2011).

B. Berdasarkan Teknik Elusi

1. Elusi isokratik

Pemisahan dimana komposisi fase gerak tetap konstan selama prosedur dipelajari elusi isokratik. Dalam elusi isokratik, lebar puncak meningkat dengan waktu retensi linier dengan jumlah pelat teoritis. Hal ini menyebabkan kerugian bahwa puncak eluting terlambat menjadi sangat datar dan luas. Terbaik untuk pemisahan sederhana. Sering digunakan dalam aplikasi kontrol kualitas yang mendukung dan dekat dengan proses pembuatan (Chen., *et al.*, 2001).

2. Elusi gradien

Pemisahan di mana komposisi fase gerak diubah selama proses pemisahan digambarkan sebagai gradien elusi. Elusi gradien mengurangi retensi komponen yang dielusi kemudian sehingga

mereka mengelusi lebih cepat, memberikan puncak yang lebih sempit. Ini juga meningkatkan bentuk puncak dan ketinggian puncak. Terbaik untuk analisis sampel kompleks. Sering digunakan dalam pengembangan metode untuk campuran yang tidak diketahui. Gradien *linear* paling populer (D'Archivio, *et al.*, 2014).

C. Berdasarkan Jenis Analisis

1. Analisis kualitatif

Analisis suatu zat yang berurutan untuk memastikan sifat konstituen kimianya dan kami dapat memisahkan komponen individu tetapi tidak dapat menilai kuantitas dalam analisis ini.

2. Analisis kuantitatif

Menentukan jumlah dan proporsi konstituen kimianya dan jumlah pengotor dan komponen individu dapat dinilai (Vare, S.R, 2016).

2.5 Validasi Metode

Validasi merupakan suatu proses untuk melakukan evaluasi rentang dan kondisi penerapan, serta memeriksa apakah setiap pengukuran di masa depan dalam analisis rutin akan memberikan konsentrasi analit yang cukup dekat dengan nilai sebenarnya (Peris-Vicente, *et al.*, 2015). Menurut Julizan (2019) validasi adalah konfirmasi melalui bukti-bukti pemeriksaan dan telah sesuai dengan tujuan pengujian. Validasi harus dilakukan terhadap terhadap metode non-standar dan metode yang dikembangkan laboratorium.

Validasi di definisikan sebagai suatu tindakan pembuktian bahwa setiap pendekatan, strategi, prosedur eksperimental, proses, staf laboratorium, instrumentasi, pereaksi, dan kondisi ruangan yang dipilih untuk melakukan metode ini akan selalu berfungsi dengan cara yang tepat dan konsisten dibawah serangkaian kondisi yang tetap. Selain itu, validasi metode juga dapat digunakan untuk mengevaluasi kesesuaian faktor-faktor secara individual (Peris-Vicente, *et al.*, 2015). Menurut CPOB, validasi

metode analisa adalah proses yang dilakukan dengan studi laboratorium yang memperlihatkan karakteristik metode sesuai dengan jenis analisa yang dikehendaki (BPOM., 2001).

Validasi terhadap suatu metode menjadi faktor yang penting karena metode analisa yang telah dibuktikan validitasnya akan memberikan hasil pengukuran yang dapat dipertanggung jawabkan dan dapat dipergunakan sebagai landasan dalam perhitungan selanjutnya (Sugihartini, dkk., 2014).

Pengujian validasi metode analisis ini dilakukan agar mendapat suatu jaminan dan pembuktian bahwa metode yang digunakan pada penelitian kadar kafein ini telah memenuhi parameter-parameter yang telah ditetapkan dalam pengujian validasi yakni meliputi selektivitas, akurasi, presisi, linieritas, *Limit of Detection* (LOD), *Limit of Quantification* (LOQ) dan *System Suitability Test*. Pengujian validasi metode analisis dilakukan agar metode ini dapat dilanjutkan ke tahap penetapan kadar dengan harapan mendapatkan hasil yang valid, dapat dipercaya, serta dapat dipertanggungjawabkan. Tabel 2.1 menunjukkan pengelompokan kategori pengujian dan parameter validasi yang dibutuhkan (USP, 2016).

Tabel 2.1 Komponen data validasi metode

Parameter analisis	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Kuantitatif	Uji batas		
Akurasi	Ya	Ya	*	*	Tidak
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak
Spesifisitas	Ya	Ya	Ya	*	Ya
Batas deteksi	Tidak	Tidak	Ya	*	Tidak
Batas kuantifikasi	Tidak	Ya	Tidak	*	Tidak
Linieritas	Ya	Ya	Tidak	*	Tidak
Rentang	Ya	Ya	*	*	Tidak

Semua prosedur analisis harus dikarakteristik dengan baik divalidasi secara lengkap, dan didokumentasi. Pengetahuan mengenai stabilitas dari bahan aktif dan/atau hasil biotransformasi dalam bahan sampel merupakan prasyarat untuk memperoleh hasil yang dapat dipercaya. Harus diperhatikan bahwa (*World Health Organization, 1997*) :

- a. Validasi dilakukan sebelum penegujian dan selama fase-fase pengujian
- b. Validasi harus mencakup tujuan penetapan kadar yang dimaksudkan
- c. Rentang kalibrasi harus sesuai dengan sampel yang di uji
- d. Bila penetapan kadar akan digunakan beberapa bagian yang berbeda, maka penetapan kadar tersebut harus divalidasi pada tiap bagian dan harus ditetapkan tingkat perbandingan silang antara bagian-bagian tersebut
- e. Prosedur penetapan kadar yang tidak secara rutin digunakan memerlukan *revalidation* yang memadai untuk memastikan bahwa prosedur tersebut dilakukan sesuai dengan prosedur asli yang telah divalidasi, studi revalidasi harus didokumentasikan, biasanya sebagai lampiran pada laporan pengujian
- f. Pada suatu studi tertentu, penggunaan dua atau lebih metode untuk penetapan kadar sampel di dalam matriks yang sama pada rentang kalibrasi yang sama sangat tidak dianjurkan
- g. Jika pengujian yang berbeda ingin dibandingkan (sampel dari pengujian-pengujian ini telah ditetapkan kadarnya dengan metode yang berbeda, dan metode-metode tersebut mencakup rentang konsentrasi yang sama dan matriks yang sama) maka pengujian-pengujian tersebut harus divalidasi ulang

Dengan memvalidasi metode, tingkat kepercayaan yang dihasilkan oleh suatu metode pengujian dan/atau kalibrasi dapat diperkirakan dengan pasti. Validasi metode analisis umumnya dilakukan terhadap 4 jenis (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2012) :

- a. Uji identifikasi
- b. Uji kuantitatif kandungan impuritas (*impurity*)
- c. Uji batas impuritas dan
- d. Uji kuantitatif zat aktif dalam sampel bahan aktif obat atau komponen tertentu dalam obat

Kesahihan metode analisis diartikan sebagai suatu prosedur yang digunakan untuk membuktikan bahwa metode analisis tersebut memberikan hasil seperti yang diharapkan dengan kecermatan dan ketelitian yang memadai (Tulandi, 2015).

2.5.1 Akurasi

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antar nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya atau nilai rujukan (Ganjar, dkk., 2007). Menurut Harmita (2014), akurasi dari suatu metode adalah kedekatan hasil kadar yang diperoleh dengan nilai kadar yang sebenarnya. Nilai akurasi dinyatakan dengan persen perolehan kembali (*recovery*) yang diperoleh dengan membuat tiga sampel dengan rentang konsentrasi 50-150%. Nilai persen perolehan kembali (*recovery*) yang dapat diterima menurut *Food and Drug Administration* (FDA) adalah antara rentang 80-120% (Harahap, 2009).

Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placeborecovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia CRM atau SRM) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan

dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. % Perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (ekspien 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.

Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui seperti obat-obatan paten, atau karena analitnya berupa suatu senyawa endogen misalnya metabolit sekunder pada kultur kalus, maka dapat dipakai metode adisi.

Metode adisi dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan. Perhitungan persen perolehan kembali dapat dihitung dengan rumus matematik dibawah ini: (Harmita, 2004).

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Konsentrasi hasil percobaan}}{\text{Konsentrasi teoritis}} \times 100\%$$

Kriteria kecermatan sangat tergantung kepada konsentrasi analit dalam matriks sampel dan pada keseksamaan metode (RSD). Vanderwielen, dkk menyatakan bahwa selisih kadar pada berbagai penentuan (Xd) harus 5% atau kurang pada setiap konsentrasi analit pada mana prosedur dilakukan (Harmita, 2004).

Pada metode penambahan baku, pengukuran blanko tidak diperlukan lagi. Metode ini tidak dapat digunakan jika penambahan analit dapat mengganggu pengukuran, misalnya analit yang ditambahkan menyebabkan kekurangan pereaksi, mengubah pH atau kapasitas dapar, dan lain-lain. Kriteria kecermatan dilakukan sama seperti pada metode simulasi.

Pada percobaan penetapan kecermatan, sedikitnya lima sampel yang mengandung analit dan plasebo yang harus disiapkan dengan kadar antara 50% sampai 150% dari kandungan yang diharapkan. Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai presisiRSD. Rentang kesalahan yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada tabel dibawah ini (Harmita, 2004).

Tabel 2.2 Persyaratan % *recovery*

Analit pada matrik sampel (%)	Rata-rata yang diperoleh (%)
100	98-102
>10	98-102
>1	97-103
>0,1	95-105
0,01	90-107
0,001	90-107
0,0001 (1 ppm)	80-110
0,00001 (100 ppb)	80-110
0,000001 (10 ppb)	60-115
0,0000001 (1 ppb)	40-120

2.5.2 Presisi

Presisi adalah tingkat kedekatan antara hasil uji individu bila prosedur diterapkan berulang kali terhadap sampling ganda atau sampel yang homogen. Presisi biasanya dinyatakan sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien korelasi) dari satu seri pengukuran. Presisi merupakan ukuran tingkat reproduibilitas mengacu pada penggunaan prosedur analisis dalam kondisi kerja normal (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2012).

Menurut Harmita (2004) keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval

waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analisis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari *batch* yang sama. Ketertiruan dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi, dan analisis yang berbeda. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Harga dari simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV) dapat dihitung menggunakan rumus dibawah ini: (Harmita, 2004).

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

Keterangan :

RSD = simpangan baku relatif

SD = standart deviasi

X = kadar sampel rata-rata

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Sebaiknya keseksamaan ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) untuk melihat pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Demikian juga harus disiapkan sampel untuk menganalisis pengaruh pengotor dan hasil degradasi terhadap keseksamaan ini (Harmita, 2004).

Keterulangan metode analisis dan biasanya dirumuskan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Metode dapat dinyatakan memiliki presisi yang baik apabila memiliki RSD 1-2% untuk senyawa aktif dalam jumlah yang banyak, sedangkan untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, RSD berkisar 5-10% (Gandjar, dkk., 2007).

Tabel 2.3 Persyaratan presisi

Konsentrasi analit dalam sampel	Batas % RSD
100%	1
10%	1,5
1%	2
0,1%	3
0,01%	4
10 µg/g (ppm)	6
1µg/g (ppm)	8
10 µg/Kg (ppb)	15

2.5.3 Selektivitas/spesifisitas

Spesifistas adalah kemampuan menguji secara tepat suatu analit dengan adanya komponen lain dan diperkirakan ada sebagai cemaran, hasil degradasi, dan matriks sampel. Ketiadaan spesifisitas dari prosedur analisis dapat diatasi dengan penggunaan prosedur analitik pendukung (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2012). Menurut Harmita (2004) selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degreeofbias*) 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.

Selektivitas ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi. Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya.

Jika cemaran dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh, maka selektivitas dapat ditunjukkan dengan cara menganalisis sampel yang mengandung cemaran atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji lalu dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan *Differential Scanning Calorimetry*. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran selektivitas. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s).

2.5.4 Linieritas dan Rentang

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas merupakan suatu metode ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x) (Gandjar, dkk., 2007). Menurut Yuwono & Indrayanto (2005) linieritas suatu hasil dapat dilihat menggunakan beberapa parameter, diantaranya hasil standar deviasi relatif (V_{x0}) yang didapat melalui rumus berikut:

$$V_{x0} = \frac{S_{xo}}{x} \times 100\%$$

Menurut Harmita (2004) 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. Dalam beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit, data yang diperoleh diolah melalui transformasi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya.

Dalam praktik, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50–150% kadar analit dalam sampel. Di dalam pustaka, sering ditemukan rentang konsentrasi yang digunakan antara 0-200%. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko.

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 arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (S_y). Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer, semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur.

Rentang adalah interval antara batas tertinggi dan batas terendah dari kadar analit yang telah dibuktikan, dapat ditentukan dengan presisi, akurasi dan linearitas yang sesuai menggunakan prosedur analisis yang ditetapkan. Rentang umumnya dinyatakan dalam satuan yang sama dengan hasil uji (misalnya persen, bpj, bpm) yang diperoleh dengan prosedur analisis ini (Helwandi, 2016).

2.5.5 Batas Deteksi (*Limit Of Detection*)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak terlalu dapat dikuantitatifkan. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu (Gandjar, dkk., 2007). LOD dapat dihitung dengan rumus $LOD = 3(SD/S)$ dimana SD didasarkan pada standar deviasi, S yaitu *Slope* kurva baku.

Menurut Harmita cara penentuan batas deteksi suatu metode berbeda-beda tergantung pada metode analisis itu menggunakan instrumen atau tidak. Pada analisis yang tidak menggunakan instrumen batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat. Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blangko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blangko dan formula dibawah ini dapat digunakan untuk perhitungan.

2.5.6 Batas Kuantifikasi (*Limit Of Quantification, LOQ*)

Menurut *United States Pharmacopeia Convention* (2007) batas kuantitasi adalah karakteristik penetapan kuantitatif pada batas rendah dari senyawa dalam matriks sampel, seperti cemaran dalam senyawa obat ruahan dan hasil degradasi dalam sediaan farmasi akhir. Batas kuantitasi adalah konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang ditetapkan dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima dalam kondisi percobaan yang telah ditetapkan. Batas kuantitasi dinyatakan sebagai konsentrasai analit (misalnya persen, bpj, bpm) dalam sampel.

Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (Gandjar, dkk., 2007). Dihitung dengan rumus $LOQ = 10(SD/S)$ dimana SD didasarkan pada standar deviasi, S yaitu *Slope* kurva baku.

2.5.7 Uji Kesesuaian Sistem (*Sistem Suitability Test*)

Menurut *United State Pharmacopea* (USP) Uji kesesuaian sistem merupakan bagian yang tidak terpisahkan dari kromatografi gas dan kromatografi cair. Mereka digunakan untuk memverifikasi bahwa resolusi dan reproduktifitas dari sistem kromatografi memadai untuk analisis yang akan dilakukan. Pengujian didasarkan pada konsep bahwa peralatan, elektronik, operasionalitas dan sampel yang akan dianalisis merupakan suatu sistem integral yang selalu dapat dievaluasi.

United States Pharmacopeia (USP) menentukan parameter yang dapat digunakan untuk menetapkan kesesuaian sistem sebelum analisis. Parameter-parameter yang digunakan meliputi: bilangan lempeng teori (N), faktor *tailing*, dan nilai standar deviasi relatif (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi. Injeksi berulang dari larutan standar digunakan untuk memastikan persyaratan dari presisi. Data 5 kali injeksi berulang digunakan untuk menghitung RSD, bila persyaratan 2,0% atau kurang, bila menggunakan persyaratan lebih dari 2,0% maka menggunakan data 6 kali injeksi berulang. *Tailing factor* (T) mengukur bentuk simetri dari puncak, *tailing factor* merupakan kesatuan untuk puncak simetri yang baik dan bila nilainya meningkat maka puncak akan berekor (*tailing*) (USP, 2016).

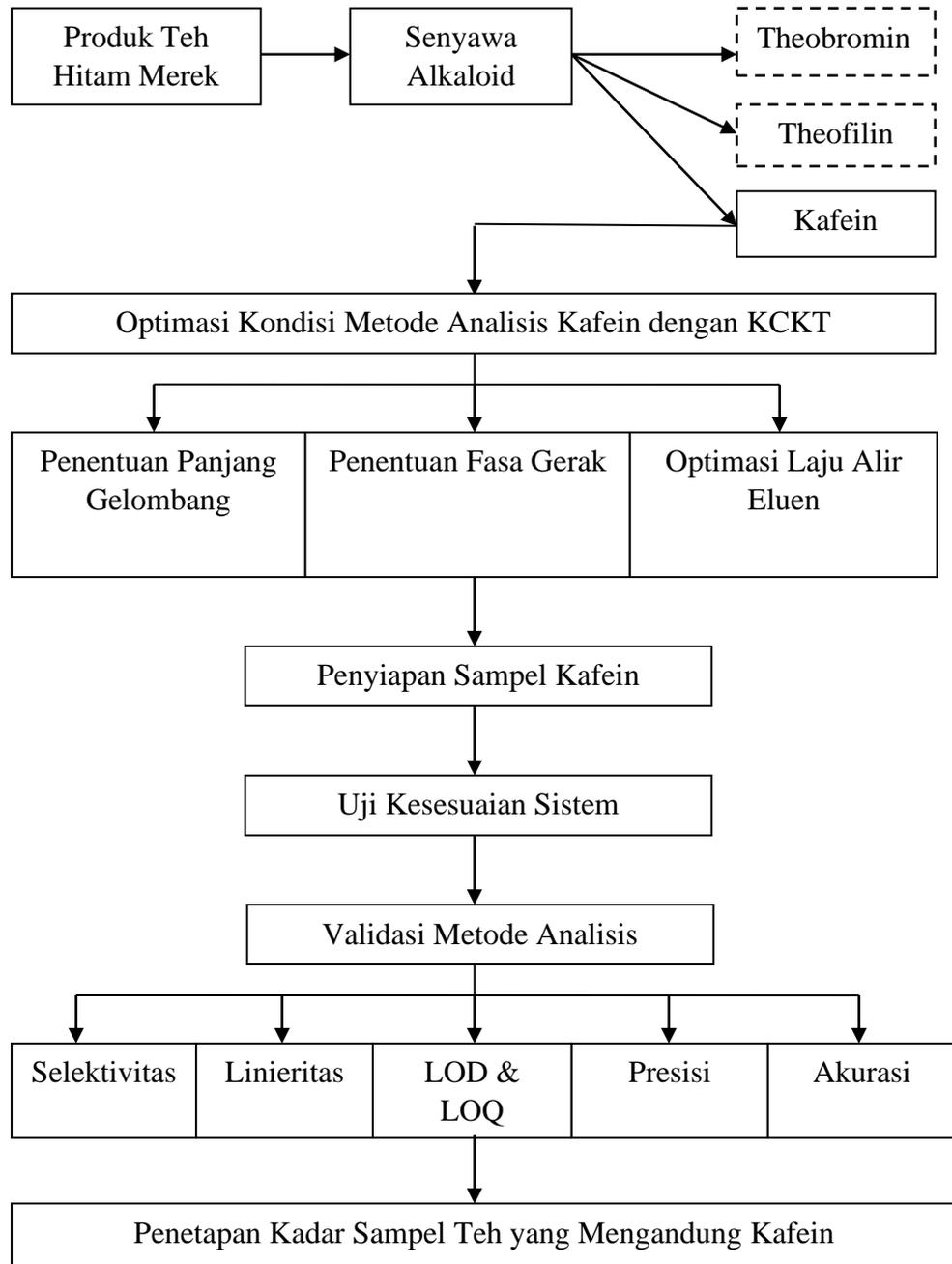
4.6 Penetapan Kadar

Penetapan kadar suatu senyawa aktif pada obat dan atau pada produk makanan dan minuman merupakan salah satu kontrol kualitas dalam menjamin keamanan suatu obat dan atau bahan obat. Sedangkan pemeriksaan suatu senyawa atau kadar zat aktif merupakan salah satu persyaratan penting yang harus dipenuhi untuk menjamin kualitas suatu produk dan atau sediaan obat, untuk melakukan penetapan kadar dibutuhkan suatu metode yang telah divalidasi sebelumnya. Berdasarkan *review* artikel oleh Patil (2012), disebutkan bahwa berbagai jenis sampel yang mengandung kafein seperti kopi, teh, minuman berenergi, dan formulasi farmasi mengandung obat dapat dianalisis menggunakan sistem KCKT fase terbalik. Metode tersebut

digunakan karena dapat menentukan kadar kafein dalam sampel kompleks (Clara Maria, 2018).

BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konseptual

3.2 Hipotesis

Pada penetapan kadar kafein dalam produk teh hitam yang ada dipasaran memenuhi parameter validasi metode analisis selektivitas, linieritas, LOD & LOQ, presisi, akurasi.

BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain yang digunakan pada penelitian ini adalah deskriptif eksperimental kuantitatif. Penelitian ini dimaksudkan untuk memberikan suatu gambaran terhadap masalah atau fenomena muncul selama penelitian, yaitu pengujian mengenai suatu metode analisa penetapan kadar kafein dalam produk teh hitam yang ada dipasaran.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi, merupakan sekumpulan objek yang memiliki kesamaan dalam satu atau beberapa hal yang membentuk masalah pokok dalam suatu penelitian. Populasi pada penelitian ini adalah semua produk teh hitam dari PTPN XII Lawang, Jawa Timur.

4.2.2 Sampel

Sampel, merupakan secuplikan tertentu yang diambil dari suatu populasi dan diteliti secara rinci. Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah hanya produk teh hitam bubuk dari PTPN XII Lawang, Jawa Timur.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitasdr. Soebandi Jember untuk melaksanakan penyiapan ekstrak dan preparasi sampel, kemudian penelitian dilanjutkan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitasdr. Soebandi Jember. Waktu penelitian dimulai pada tanggal Februari sampai Mei 2021.

4.4 Definisi Operasional

Definisi operasional variabel adalah seperangkat petunjuk tentang apa yang harus diamati dan diukur untuk menguji kesempurnaan. Definisi operasional ditemukan item-item yang dituangkan dalam instrumen penelitian (Sugiyono, 2014).

4.4.1 Produk teh hitam berbentuk bubuk yang diperoleh dari PT.Perkebunan Nusantara XII Lawang, Jawa Timur.

4.4.2 Instrumen kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merek Agilent yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan fase diam kolom *poroshell* 120 EC C-18 serta komposisi fase gerak asetonitril:metanol:*aquabidestilata*(80:5:15) dengan kecepatan alir 1,4 mL/menit.

4.4.3 Kadar kafein dinyatakan dalam satuan ppm (*parts per million*).

Tabel 4.1 Definisi Operasional Parameter Validasi Metode Analisis

No	Nama Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Linieritas	Kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan (Harmita, 2004)	KCKT	Pengujian linieritas di ukur dengan cara luas area yang diperoleh diplotkan dengan konsentrasi analit lalu dihitung nilai r nya	Satuan hasil ukur linieritas dinyatakan dalam nilai r	<i>Ratio</i>
2.	Batas Deteksi	Jumlah terkecil analit dalam	KCKT	Pengujian batas deteksi	Satuan hasil ukur batas	<i>Ratio</i>

		sampel yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko (Harmita, 2004)		dilakukan dengan mengukur konsentrasi yang diinjeksikan pada rasio sinyal terhadap <i>noise</i> yang dibagi dengan luas area yang diperoleh	deteksi dinyatakan dalam ppm	
3.	Batas Kuantitasi	Kuantaitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria akurasi dan presisi (Harmita, 2004)	KCKT	Pengujian batas kuantitasi dengan cara mengukur konsentrasi yang diinjeksikan pada rasio sinyal terhadap <i>noise</i> yang dibagi dengan luas yang diperoleh	Satuan hasil ukur batas kuantitasi dinyatakan dalam ppm	<i>Ratio</i>
4.	Spesifisitas	Kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (Harmita, 2004)	KCKT	Pengujian spesifisitas dilakukan dengan cara membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, dan senyawa sejenis.	Satuan hasil ukur spesifisitas dinyatakan dalam Rs	<i>Ratio</i>

5.	Akurasi	Ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya (Harmita, 2004)	KCKT	Pengujian akurasi dengan cara membagi hasil konsentrasi analit yang didapat dengan konsentrasi analit yang sebenarnya	Satuan hasil ukur akurasi biasanya dinyatakan dalam %	<i>Ratio</i>
6.	Presisi	Merupakan ukuran keterulangan metode analisis (Harmita, 2004)	KCKT	Pengujian presisi dengan cara luas area yang diperoleh dirata-ratakan dan dihitung nilai RSD nya	Satuan hasil ukur presisi dinyatakan dalam %	<i>Ratio</i>

4.5 Instrumen Pengumpulan Data

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain Instrumen KCKT merek *Agilent* dilengkapi dengan detektor *Photodiode Array Detector*(PDA) serta kolom *poroshell 120 EC C-18*, 4,6 x 150 mm, 4 μ , KCKT *solvent filtration*, pompa vakum, *microsyringe* 20 μ l, membran filter nilon 0,45 μ m, spektrofotometer Uv-vis, *vortex*, timbangan analitik, pipet volume, labu ukur, corong pisah, gelas beker, dan erlenmeyer.

4.6 Tahapan Penelitian

1. Penyiapan Ekstrak

Serbuk teh sebanyak 20 gram diseduh dalam 200 mL aquades pada suhu penyeduhan 90°C selama 5 menit. Larutan teh hitam panas kemudian disaring melalui corong dengan kertas saring ke dalam

erlenmeyer. Ekstraksi kafein dilakukan dengan menambahkan 1,5 gram CaCO_3 dan 25 mL kloroform ke dalam corong pisah yang berisi filtrat teh hitam. Kocok campuran tersebut hingga membentuk 2 lapisan. Penambahan 25 mL kloroform diulang sebanyak 3 kali. Ekstraksi kafein direplikasi 3 kali (Wardani, dkk., 2016).

2. Preparasi Sampel

Filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi ditampung pada mikrotube kemudian ditambahkan 40 μL NaOH 10 N. Selanjutnya diekstraksi dengan 1 mL kloroform lalu *divortex*. Fase kloroform diambil dan ditampung dalam suatu wadah. Ekstraksi menggunakan kloroform dilakukan tiga kali untuk masing-masing larutan sampel teh kemudian diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 90°C dalam lemari asam sampai diperoleh ekstrak kering kafein. Ekstrak yang didapat kemudian dilarutkan dengan 1 mL pelarut. Larutan tersebut disaring menggunakan *syringe filter* ukuran pori 0,45 μm lalu diawudarkan menggunakan ultrasonikator selama 5 menit. Dilakukan replikasi tiga kali (Clara Maria, 2018).

3. Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan terdiri dari asetonitril:metanol:*aquabidestilata* dengan perbandingan 80:5:15. Masing-masing larutan disaring menggunakan kertas saring *whatman* pada corong *buchner* dengan bantuan pompa vakum, selanjutnya diawudarkan menggunakan alat ultrasonikator selama 5 menit (Clara Maria, 2018).

4. Pembuatan Pelarut

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah terdiri dari campuran metanol dan *aquadestilata* dengan perbandingan 30:70, kemudian larutan disaring menggunakan penyaring kertas *whatman* 0,45 μm pada corong *buchner* yang dibantu dengan pompa vakum

kemudian diawaudarakan menggunakan ultrasonik selama 5 menit(Denis Yulius, 2018).

5. Pembuatan Larutan Baku Kafein

Sebanyak kurang lebih 25 mg baku kafein ditimbang secara seksama dan dilarutkan dengan pelarut dalam labu takar 50 mL, sehingga didapatkan larutan stok kafein konsentrasi 500 µg/mL(Denis Yulius, 2018).

6. Optimasi KCKT

a. Optimasi Laju Alir

Pengaruh laju alir 1,0; 1,2; 1,4 per menit pada pemisahan analit telah dipelajari. Menurut Rahim, dkk (2014)tercatat bahwa waktu retensi menurun dengan meningkatnya laju aliran dan semua puncak yang dihasilkan bagus.

b. Penentuan Fase Gerak

Optimasi fase gerak dilakukan untuk mencari perbandingan yang dapat memberikan kromatogram terbaik dengan menggunakan variasi fase gerak metanol : *aquabidestilata*(50:50), metanol:*aquabidestilata*:asam asetat glasial 2%(50:48:2), asetronitril:metanol:*aquabidestilata*(80:5:15).

c. Penentuan Panjang Gelombang

Penentuan panjang gelombang maksimum kafein dilakukan pada konsentrasi 100, 300 dan 500 µg/mL yang diperoleh dari larutan intermediet kafein kadar 1000 µg/mL. Kemudian masing-masing larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 200-800 nm menggunakan alat spektrofotometer UV. Panjang gelombang maksimum ditentukan berdasarkan spektra dengan serapan yang maksimal (Denis Yulius, 2018).

7. Pembuatan Seri Baku Kafein

Larutan stok kafein konsentrasi 500 µg/mL di ambil sebanyak 0,2; 1,0; 2,0; 4,0 dan 6,0 mL masukkan ke dalam labu takar 10 mL dan diberi tanda. Ke dalam masing-masing larutan, ditambahkan sejumlah 40 µL NaOH 10 N dan diekstraksi dengan kloroform sebanyak 1 mL menggunakan *vortex* yang dilakukan tiga kali berturut-turut (Denis Yulius, 2018).

8. Uji Kesesuaian Sistem

Uji Kesesuaian Sistem (UKS) atau *System Suitability Test* (SST) terhadap instrumen KCKT yang akan digunakan perlu dilakukan sebelum validasi metode. UKS dilakukan dengan penyuntikan satu konsentrasi larutan baku ke dalam sistem KCKT pada kondisi terpilih. Penyuntikan dilakukan pengulangan (replikasi) lima sampai enam kali. Parameter yang diukur dalam UKS ini antara lain, *repeatabilitas*, waktu retensi dan luas area dari baku kafein. Hasil parameter-parameter tersebut dilakukan evaluasi terhadap nilai keberterimaannya. Puncak-puncak analit harus menunjukkan daya pisah yang baik. Persyaratan keberterimaan RSD <2% (Yuwono & Indrayanto, 2005).

9. Validasi Metode Analisis

a. Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan dengan memipet sejumlah tertentu sampel kemudian dilarutkan dengan pelarut sampai didapatkan konsentrasi kafein sesuai dengan hasil optimasi konsentrasi uji. Larutan yang sudah dibuat disaring dengan menggunakan membran filter *whatman* 0,22 µm dan kemudian diinjeksikan pada instrumen KCKT dengan metode terpilih. Pada resolusi (R_s) yang menyatakan keterpisahan dua senyawa atau puncak yang berdekatan dalam kromatogram. Dikatakan selektif jika nilai $R_s > 1,5$ (Yuwono & Indrayanto, 2005).

b. Linieritas

Data linieritas diperoleh dengan membuat delapan titik konsentrasi dari larutan standar kafein dengan rentang konsentrasi antara 50-120% dari konsentrasi sampel. Larutan standar kafein kemudian disaring dan disuntikkan pada sistem KCKT. Dari kromatogram akan diperoleh nilai AUC untuk masing-masing seri konsentrasi. Kemudian nilai AUC tersebut diplotkan terhadap masing-masing seri konsentrasi baku kafein untuk menghitung persamaan garis regresi $y = bx + a$ dan harga r (koefisien korelasi) (Febri Annuryanti, dkk., 2018).

c. Limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ)

Data limit deteksi dan kuantifikasi diperoleh dari 6 titik seri konsentrasi terkecil dari larutan standar kafein yang nilainya masih dapat memberikan respon ketika diinjeksikan pada kondisi KCKT terpilih. Nilai LOD dan LOQ dihitung berdasarkan data simpangan baku dan *slope* (Febri Annuryanti, dkk., 2018).

d. Presisi

Larutan standar kafein dengan seri konsentrasi antara 50%-120% dari konsentrasi uji dibuat dalam pelarut sebanyak 6 macam konsentrasi. Kemudian injeksikan larutan standar kafein pada sistem KCKT terpilih sebanyak 6 kali pengulangan, lalu dihitung nilai Koefisien Korelasinya (KV) harus tidak $<2\%$ (Febri Annuryanti, dkk., 2018).

e. Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku standar atau dengan cara adisi standar. Sampel adisi yang telah dipreparasi dengan konsentrasi 100 ppm pada produk teh hitam yang mengandung kafein ditambah dengan larutan standar kafein hingga mencapai konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Masing-masing sampel adisi dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Sampel uji akurasi kemudian disaring dan diinjeksikan ke dalam sistem KCKT dengan kondisi terpilih. Menghitung nilai parameter

akurasi dari data hasil *scanning* dengan cara membandingkan hasil kadar sampel dengan kadar standar analit untuk masing-masing seri konsentrasi dan dicocokkan hasilnya dengan persyaratan nilai akurasi. Data yang diperoleh diolah untuk memperoleh nilai % perolehan kembali (Febri Annuryanti, dkk., 2018).

11. Penetapan Kadar Kafein

Sebanyak 20 gram bubuk teh hitam dimasukkan ke dalam gelas piala kemudian ditambahkan 200 mL akuades panas kedalamnya sambil diaduk. Larutan teh hitam panas disaring melalui corong dengan kertas saring ke dalam erlenmeyer, kemudian 1,5 g kalsium karbonat (CaCO_3) dan larutan teh hitam tadi dimasukkan ke dalam corong pisah lalu di ekstraksi sebanyak 4 kali, masing-masing dengan penambahan 25 mL kloroform. Lapisan bawahnya diambil, kemudian ekstrak (fase kloroform) ini diuapkan dengan rotari evaporator hingga kloroform menguap seluruhnya. Ekstrak kafein bebas pelarut dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, dan di encerkan dengan *aquadestilata* hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan kemudian ditentukan kadarnya dengan instrumen KCKT (Hari Susanti, dkk., 2019). Ekstrak kering teh hitam kemudian ditimbang sebanyak 0,01 gram sehingga didapatkan konsentrasi sebesar 1000 ppm, masukkan ke labu takar 10 mL, tambahkan aquadest sampai tanda batas. Larutan sampel di saring terlebih dahulusebelum diinjekkan ke instrumen KCKT.

4.7 Aplikasi Metode Analisis Pada Penetapan Kadar Kafein

Sumber data yang diperoleh pada penelitian ini adalah data primer dimana data diperoleh dari hasil pengukuran langsung konsentrasi kafein dalam produk teh hitam yang ada dipasaran menggunakan instrumen KCKT di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas dr.Soebandi Jember. Data yang diperoleh dibuat kurva kalibrasi dan ditentukan nilai parameter-parameter validasi metodenya seperti nilai linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi, presisi, dan selektivitas.

BAB 5. HASIL PENELITIAN

5.1 Pengumpulan Sampel

5.1.1 Penyiapan Ekstrak

Ekstrak teh hitam dengan pelarut *aquadest* yang diperoleh dari sampel produk teh hitam PTPN XII Lawang, Jawa Timur ditimbang sebanyak 20 gram bubuk sampel teh hitam dengan bobot rendemen ekstrak sebesar 0,06 gram (6,65%) dengan warna ekstrak coklat tua.

5.1.2 Preparasi Sampel

Sampel yang diinjeksikan ke sistem KCKT merupakan filtrat yang telah dipisahkan dari koloid menggunakan metode pemisahan koloid dekantasi karena pada sampel teh hitam terdapat kandungan senyawa-senyawa koloid seperti tanin, protein, dan lemak yang memiliki bobot molekul besar dimana dapat menyumbat kolom, sehingga perlu untuk dilakukan preparasi sampel untuk menghilangkan senyawa-senyawa dalam sampel teh hitam yang mungkin dapat mengganggu analisis pada sistem KCKT.

5.2 Optimasi Kodisi KCKT

5.2.1 Optimasi Laju Alir

Optimasi laju alir dilakukan dengan cara memvariasikan kecepatan alir pada sistem KCKT 1,0; 1,2 dan 1,4 mL/menit. Laju alir yang semakin tinggi dari 1,0 mL/menit dapat menyebabkan tekanan dalam kolom meningkat sehingga dapat merusak kolom dan semakin cepat laju alir maka waktu retensi yang dihasilkan semakin pendek (Nofita, dkk., 2018). Hasil optimasi laju alir pada KCKT ditunjukkan pada tabel 5.5.

Tabel 5.1 Hasil optimasi laju alir pada KCKT

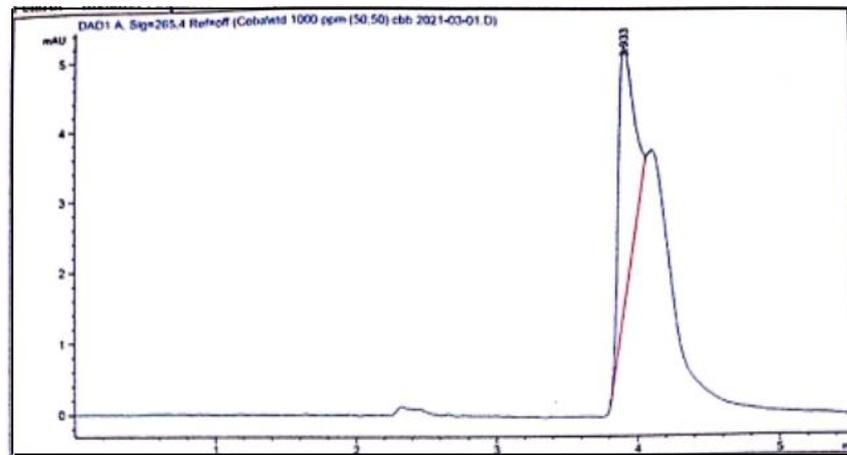
Laju Alir	<i>Symmetry</i>	N > 2000	Tr
1,0	0,81	3244	1,4
1,2	0,36	1006	1,9
1,4	0,24	673	3,8

Hasil data yang didapat dengan laju alir 1,0 mL/menit, menghasilkan waktu retensi yang lebih pendek serta nilai *symmetry* dan plat teori (N) lebih besar jika dibandingkan pada laju alir 1,2 dan 1,4 mL/menit.

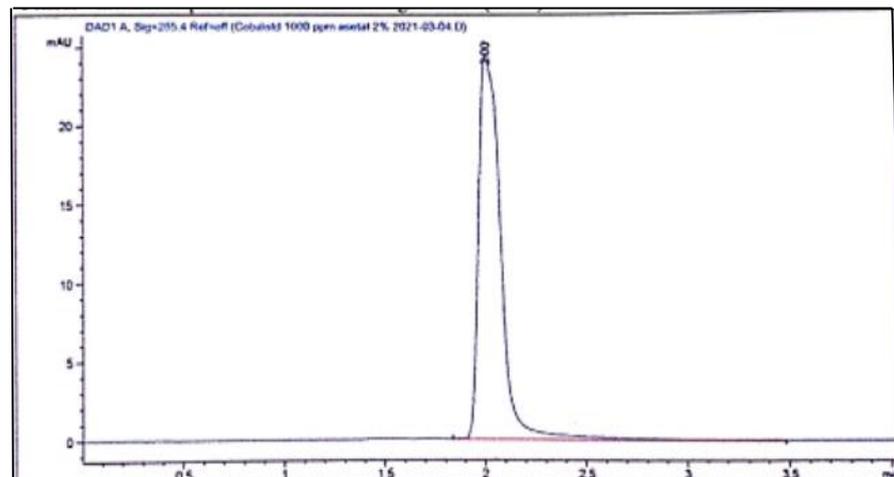
5.2.2 Penentuan Fase Gerak

Optimasi fase gerak dilakukan untuk mendapatkan profil kromatogram senyawa kafein yang mempunyai bentuk *peak* yang bagus. Agus Siswanto, (2016) mengatakan bahwa pemilihan fase gerak yang sesuai dilakukan berdasarkan indikator yaitu memiliki waktu retensi yang pendek <10 menit. Data nilai waktu retensi komposisi fase gerak terpilih yang diperoleh dari standar kafein disajikan pada Tabel 5.1 komposisi fase gerak yang menghasilkan waktu retensi (<10 menit), *tailing factor* ≤ 2 , dan pemisahan puncak terbaik dipilih untuk digunakan pada penelitian ini.

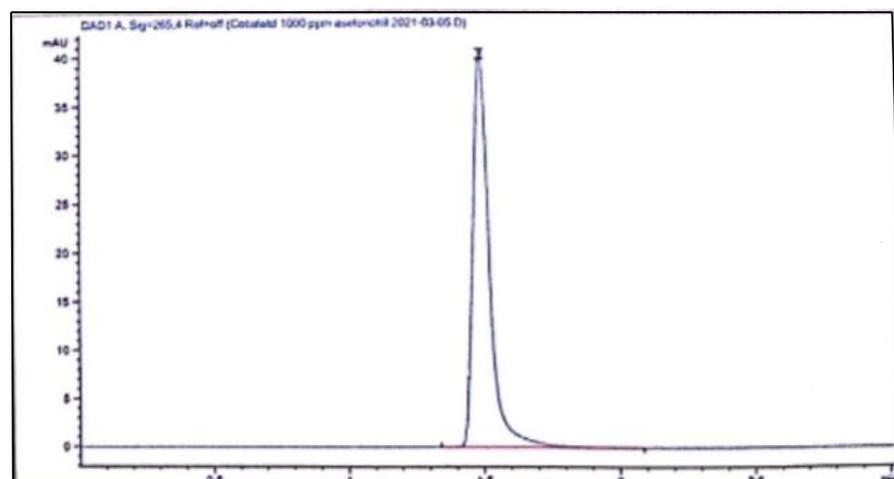
(a). Eluen= Metanol : *aquabidestilata* (50:50)



(b). Eluen = Metanol : *aquabidestilata*: asam asetat glasial 2% (50:48:2)



(c). Eluen = Asetonitril : metanol : *aquabidestilata* (80:5:15)



Gambar 5.1 (a) eluen = metanol : *aquabidestilata* (50:50) (b) eluen = metanol : *aquabidestilata*: asam asetat glasial 2% (50:48:2) (c) eluen = asetonitril : metanol : *aquabidestilata* (80:5:15)

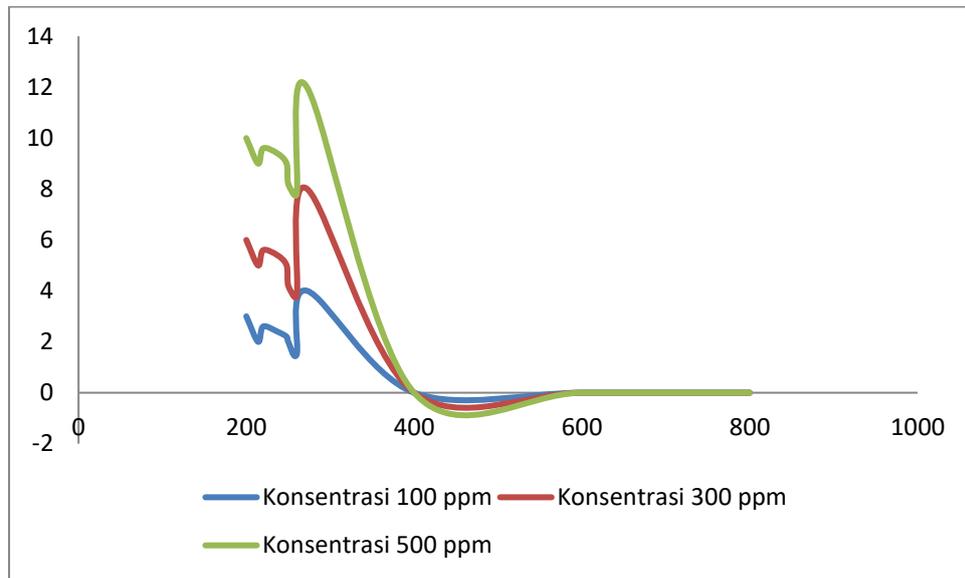
Tabel 5.2 Data Waktu Retensi Komposisi Fase Gerak Terpilih Standar Kafein
1000 ppm

Komposisi Fase Gerak	<i>Symmetry</i>	N > 2000	tR
Metanol: <i>aquabidestilata</i> (50:50)	0,94	2881	3,39
Metanol: <i>aquabidestilata</i> :asam asetat glasial 2% (50:48:2)	0,48	1650	2,00
Asetonitril:metanol: <i>aquabidestilata</i> (80:5:15)	0,67	3193	1,48

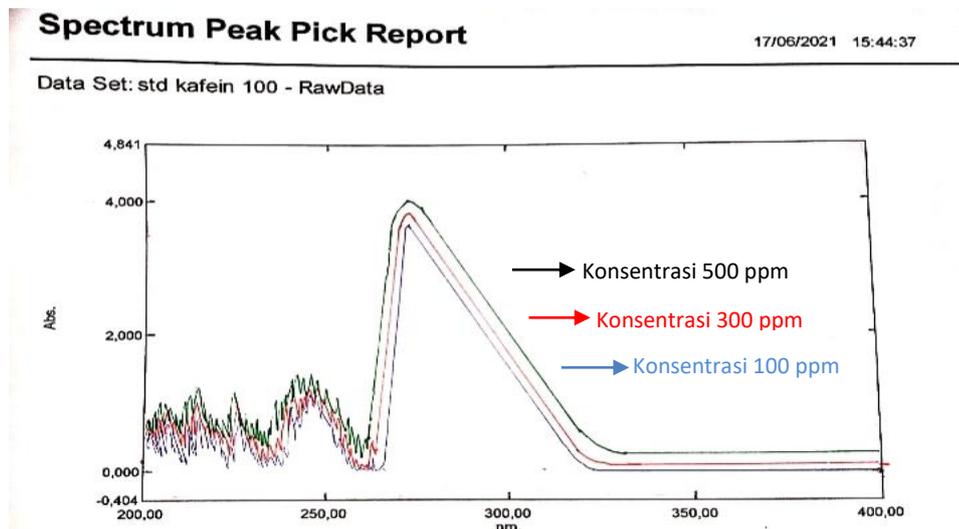
Komposisi fase gerak yang terpilih dari beberapa komposisi fase gerak yang digunakan untuk analisis yaitu asetonitril : metanol : *aquabidestilata* (80:5:15) pada panjang gelombang 272 nm.

5.2.3 Penentuan Panjang Gelombang

Penentuan panjang gelombang maksimum pada senyawa kafein dilakukan menggunakan tiga seri konsentrasi larutan standar kafein dengan konsentrasi 100 ppm, 300 ppm, 500 ppm bertujuan untuk memastikan bahwa pada panjang gelombang yang diperoleh terjadi serapan maksimal senyawa kafein. Berdasarkan hasil penelitian absorbansi dari larutan standar kafein (Gambar 5.3), dipilih panjang gelombang 272 nm pada konsentrasi 500 ppm untuk analisis kadar kafein dalam produk teh hitam karena pada panjang gelombang tersebut menghasilkan absorbansi paling maksimum dari senyawa kafein.



Gambar 5.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



Gambar 5.3 Spektrum Panjang Gelombang Maksimum Standar Kafein Konsentrasi 100 ppm, 300 ppm, 500 ppm dalam pelarut metanol : *aquadestilata* (50:50).

5.3 Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

Uji kesesuaian sistem (UKS) dilakukan dengan membuat larutan standar kafein pada konsentrasi 500 ppm kemudian diinjeksikan sejumlah

20 μL melalui injektor ke dalam sistem KCKT sebanyak 6 kali pengulangan. Digunakan kecepatan alir hasil optimasi yaitu 1,0 dan panjang gelombang hasil optimasi yaitu diatur pada λ 272 nm. Kromatogram yang diperoleh untuk tiap injeksi digunakan untuk menentukan keterulangan penyuntikan larutan baku, yang dinyatakan dalam waktu retensi dan area yang baik. Hasil uji kesesuaian sistem (UKS) standar kafein ditunjukkan pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil Uji Kesesuaian Sistem (UKS) keterulangan waktu retensi dan area puncak standar kafein.

Replikasi	tR (Menit)	Area
1	1,49	188,89546
2	1,48	189,85642
3	1,48	188,69541
4	1,48	189,99745
5	1,48	189,30344
6	1,48	188,15847
SD	0,00408	0,70644
Rata-rata	1,48166	189,15110
RSD	0,27536%	0,37347%

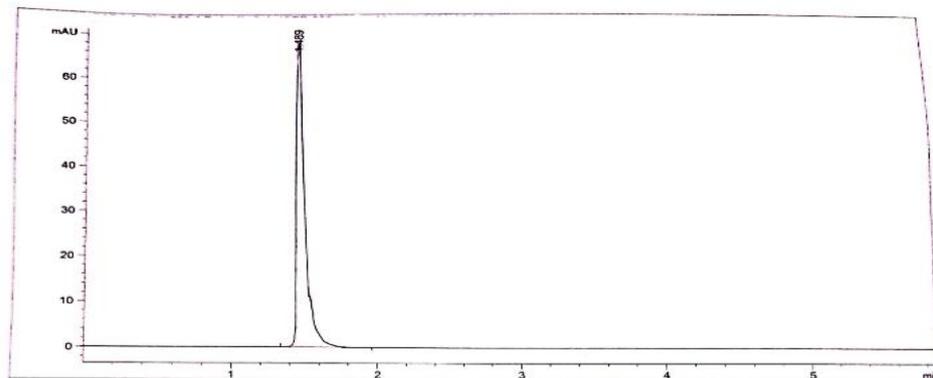
Hasil UKS menunjukkan keterulangan waktu retensi dan area yang memenuhi persyaratan yaitu $\text{RSD} < 2\%$, dimana keterulangan waktu retensi menghasilkan $\text{RSD} 0,253\%$ dan keterulangan area menghasilkan $\text{RSD} 0,3\%$ (Gandjar dan Rahman, 2007).

5.4 Validasi Metode Analisis

5.4.1 Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan suatu metode analisis untuk memisahkan analit secara tepat dalam matriks sampel yang masih terdapat senyawa-senyawa lain. Pengujian selektivitas dilakukan dengan menyuntikkan sampel teh hitam sebanyak 3 kali replikasi, kemudian diamati dari pemisahan puncak kafein dalam sampel teh hitam dan dinyatakan dengan nilai resolusi (R_s). Menurut AOAC (2013) nilai keberterimaan resolusi yang baik yaitu $\geq 1,5$. Hasil penentuan selektivitas ditunjukkan pada tabel 5.4.

(a). Replikasi 1 Uji Selektivitas



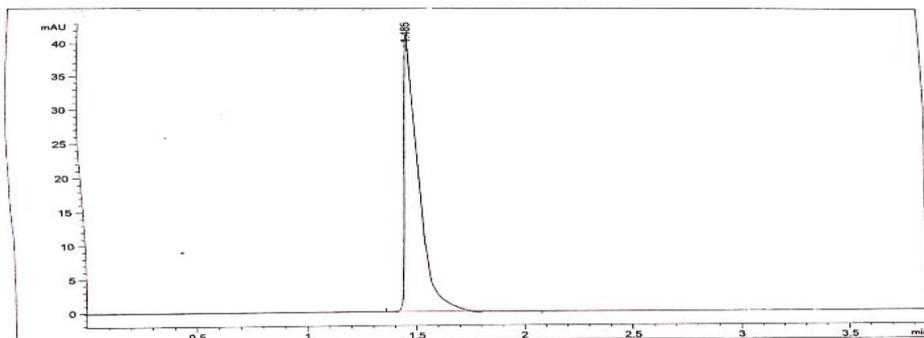
```

=====
                          Area Percent Report with Performance
=====
Multiplier      :      1.0000
Dilution        :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

RetTime   k'   Area   Height   Symm.   Width   Plates   Resol   Select
 [min]    -   [mAU*s] [mAU]   -   [min]   -   -   -   -
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 1.489   -   259.14966  68.21699  0.64  0.0552  4018   -   -

```

(b). Replikasi 2 Uji Selektivitas

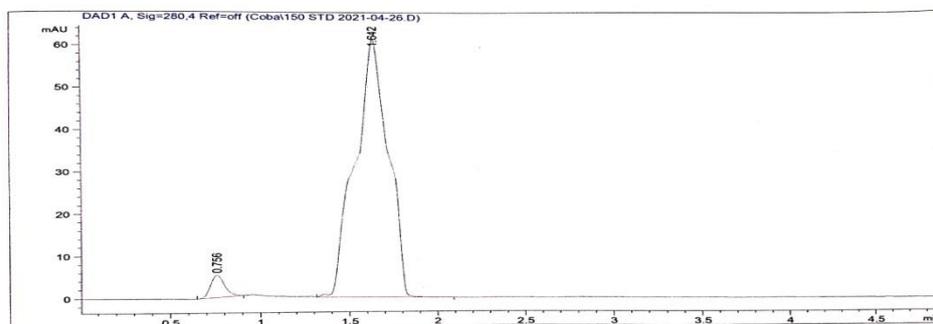


=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.485	-	191.10756	41.28025	0.53	0.0677	2676	-	-

(c). Replikasi 3 Uji Selektivitas



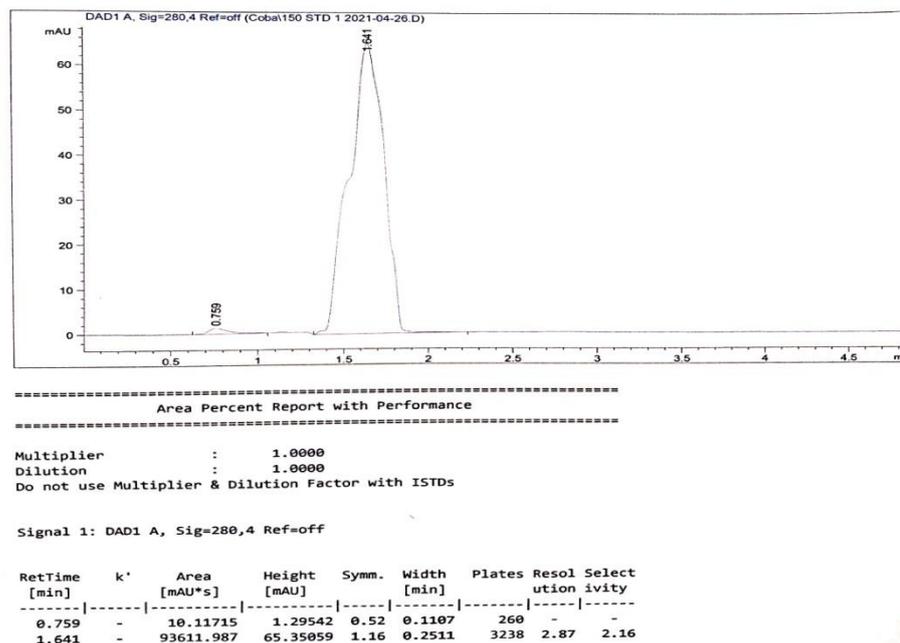
=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
0.756	-	28.40928	5.25886	0.78	0.0844	441	-	-
1.642	-	80364.453	61.60928	1.23	0.2101	3337	3.54	2.17

(d). Replikasi 4 Uji Selektivitas



Gambar 5.4 (a) replikasi 1 standar tanpa pengganggu (b) replikasi 2 sampel tanpa pengganggu (c) standar dengan analit lain (d) sampel dengan analit lain.

Tabel 5.4 Data Resolusi Kafein pada Sampel Teh Hitam

Replikasi	Nama pengujian	Rs	Rt
1	Standar tanpa pengganggu	-	1,489
2	Sampel tanpa pengganggu	-	1,485
3	Standar dengan analit lain	3,54	1,642
4	Sampel dengan analit lain	2,87	1,641

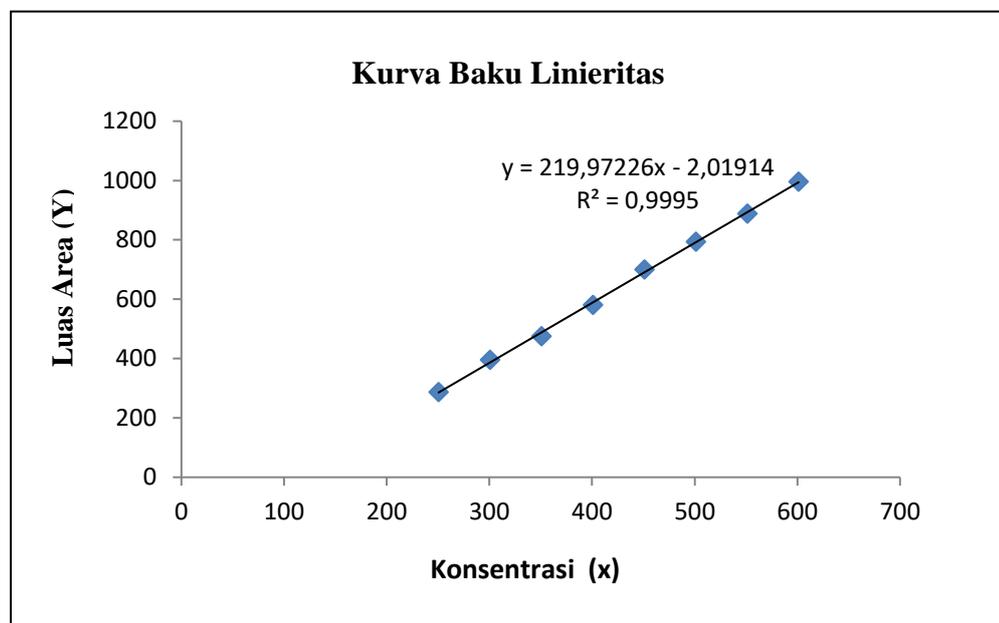
Tabel 5.4 menunjukkan resolusi kafein pada sampel teh hitam dan standar, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa seluruhnya memenuhi kriteria resolusi maka metode analisis yang digunakan pada penelitian ini memiliki selektivitas yang baik karena dapat memisahkan senyawa kafein (analit) dari senyawa lainnya dalam sampel (Harmita, 2004).

5.4.2 Linieritas

Linieritas ditentukan dengan membuat serangkaian larutan standar kafein dengan konsentrasi 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm, 500 ppm, 550 ppm, dan 600 ppm yang kemudian diinjeksikan ke sistem KCKT. Selanjutnya masing-masing konsentrasi diamati areanya lalu dibuat persamaan regresinya.

Tabel 5.5 Kurva Baku Linieritas Standar Kafein

Kadar (ppm) (x)	Area (mAU) (y)
250,5	286,88400
300,6	395,74413
350,7	475,51473
400,8	581,25429
450,9	699,91466
501	793,47499
551,1	888,94475
601,2	996,30296
$Y = 219,97226x - 2,01914$	
$r = 0,9995$	
$V_{x0} = 0,11199\%$	



Gambar 5.5 KurvaBaku Linieritas Standar Kafein

Dari hasil uji linieritas diperoleh persamaan regresi linier $y = 2,01914x - 219,97226$ dengan nilai koefisien korelasi ($r = 0,9995$) untuk $n \geq 6$. Parameter linieritas yang lain yaitu nilai V_{x0} , pada penelitian ini didapatkan nilai V_{x0} sebesar 0,11201%. Koefisien menunjukkan linieritas nilai $r > 0,999$ sedangkan persyaratan nilai V_{x0} sebagai parameter lain dari uji linieritas nilainya harus kurang dari 5% (Yuwono dan Indrayanto, 2005). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang linier antara konsentrasi standar kafein dengan area sehingga persamaan linieritas tersebut dapat digunakan untuk penetapan kadar kafein pada sampel teh hitam.

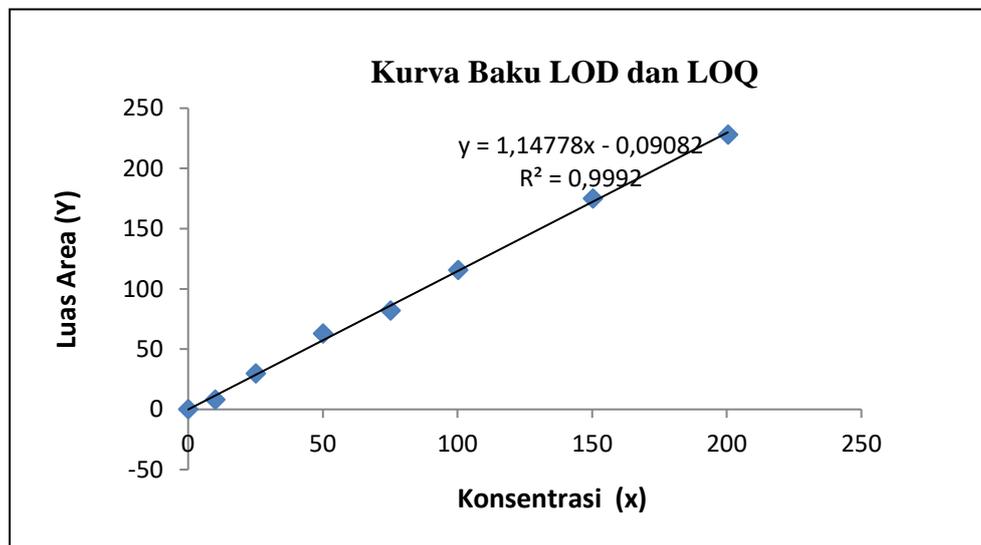
5.4.3 Limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ)

Penentuan uji batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan menyuntikkan 8 titik konsentrasi standar kafein menggunakan konsentrasi hasil optimasi sampai diperoleh titik konsentrasi terkecil yaitu 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm, 75 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, dan 0 ppm.

Tabel 5.6 Kurva Baku LOD dan LOQ Standar Kafein

x (ppm)	y (mAU)
0	0
10,02	7,94268
25,05	29,67605
50,1	62,69912
75,15	81,97674
100,2	115,55209
150,3	175,02178
200,4	227,95134
$y = 1,14778x - 0,09082$	
$r = 0,9992$	
$SD = 8,11949$	

LOD =8,78525ppm
LOQ =29,28418 ppm



Gambar 5.6 Kurva Baku LOD dan LOQ Standar Kafein

Hasil uji limit deteksi dan limit kuantitasi diperoleh dari hasil persamaan garis regresi $y = 1,14778x - 0,09082$ dengan nilai $r = 0,9992$ serta nilai SD yang diperoleh yaitu 3,36118. Nilai limit deteksi dan limit kuantitasi dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Limit deteksi} = \frac{3 \times SD}{\text{slope}}$$

$$\text{Limit kuantitasi} = \frac{10 \times SD}{\text{slope}}$$

Dari persamaan garis regresi pada tabel 5.7 maka diperoleh nilai limit deteksi (LOD) sebesar 8,78525ppm dan nilai limit kuantitasi (LOQ) sebesar 29,28418ppm.

5.4.4 Presisi

Uji presisi dilakukan dengan larutan standar kafein yang telah di preparasi sampai diperoleh konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Kemudian injeksikan masing-masing konsentrasi pada sistem KCKT terpilih sebanyak

6 kali pengulangan, lalu hitung nilai Koefisien Korelasinya (KV) nilai yang diperoleh harus $< 2\%$.

Tabel 5.7 Presisi Konsentrasi 80%

Konsentrasi 80%	
Penyuntikan ke-	Area (y)
1	263,58401
2	261,58732
3	264,43710
4	260,38457
5	263,43712
6	262,38434
X = 262,63574	
SD = 1,48435	
% KV = 0,56517%	

Tabel 5.8 Presisi Konsentrasi 100%

Konsentrasi 100%	
Penyuntikan ke-	Area (y)
1	177,55341
2	175,95109
3	178,18457
4	178,11487
5	176,51461
6	175,91190
X = 177,03840	
SD = 1,04530	

% KV = 0,59043%

Tabel 5.9 Presisi Konsentrasi 120%

Konsentrasi 120%	
Penyuntikan ke-	Area (y)
1	361,18519
2	360,48709
3	368,58329
4	362,55119
5	364,98909
6	369,48129
X = 364,54619	
SD = 3,81056	
% KV = 1,04528%	

Hasil penentuan uji presisi yang dilakukan dengan membuat larutan standar kafein masing-masing konsentrasi direplikasi 6 kali dengan metode *standard addition* menunjukkan nilai %KV pada konsentrasi 80%, 100% dan 120% kurang dari 2% dimana nilai tersebut telah memenuhi persyaratan untuk uji presisi (AOAC, 2013).

5.4.5 Akurasi

Akurasi adalah kedekatan hasil yang diperoleh pada saat penelitian dibandingkan dengan hasil sebenarnya (*true value*). Penentuan akurasi dilakukan menggunakan metode penambahan baku standar atau adisi standar yaitu dengan cara membuat 3 seri konsentrasi baku kafein masing-masing dengan 3 kali replikasi. Dari hasil pengukuran, didapatkan nilai AUC diolah menggunakan persamaan kurva baku sehingga diperoleh data konsentrasi terukur dan konsentrasi sebenarnya. Hasil perhitungan ditunjukkan pada tabel 5.1 nilai persen *recovery* atau keterulangan kemudian dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% Recovery = \frac{\text{Konsentrasi hasil percobaan}}{\text{Konsentrasi teoritis}} \times 100\%$$

Tabel 5.10 Hasil Uji Akurasi

Konsentrasi	Replikasi	Kadar teoritis	Kadar sebenarnya	% Recovery	Rata-rata & CV(%)
80%	1	400 ppm	401 ppm	99,75%	99,25%
	2	400 ppm	405 ppm	98,76%	
	3	400 ppm	403 ppm	99,25%	
100%	1	500 ppm	502 ppm	99,60%	98,67%
	2	500 ppm	508 ppm	98,42%	
	3	500 ppm	510 ppm	98%	
120%	1	600 ppm	600,1 ppm	100,01%	100%
	2	600 ppm	600,0 ppm	100%	
	3	600 ppm	600,1 ppm	100,01%	

Hasil nilai akurasi standar kafein di dalam matriks dengan metode *standard addition* memenuhi persyaratan yaitu % *recovery* 98-102% jika konsentrasi analit dalam sampel 100% sesuai persyaratan yang ditetapkan oleh Harmita (2004).

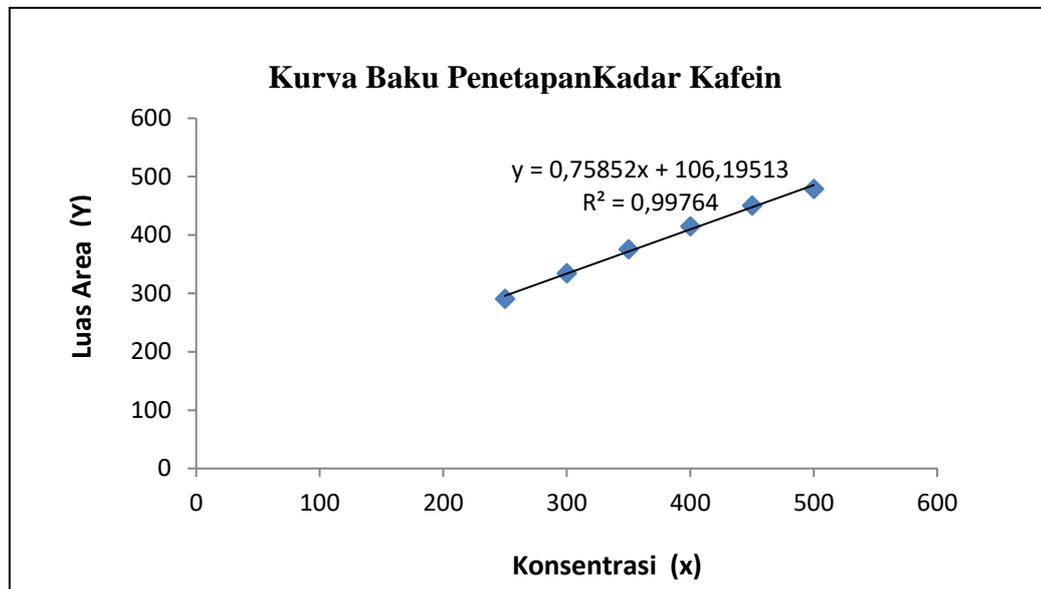
5.5 Penetapan Kadar

Penetapan kadar kafein dalam produk teh hitam dihitung berdasarkan hasil validasi metode analisis yang telah dilakukan sebelumnya menggunakan sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik dengan komposisi fase gerak asetronitril : *aquabidestilata* (80:5:15), fase diam kolom *poroshell* 120 EC C-18, kecepatan alir 1,0 mL/menit dan dengan detektor *Photodiode Array Detector* (PDA) pada panjang gelombang 272 nm. Melalui tahap validasi diperoleh parameter-parameter validasi yang telah memenuhi syarat meliputi selektivitas, linieritas, limit deteksi (LOD), limit kuantitasi (LOQ), presisi dan akurasi.

Penetapan kadar kafein ini dihitung berdasarkan persamaan kurva baku yang telah diperoleh. Perhitungan kadar kafein dalam sampel dapat dilihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.11 Kurva Baku Penetapan Kadar Standar Kafein

Konsentrasi (ppm) (x)	Luas Area (AUC) (y)
250	290,67112
300	334,24403
350	375,35570
400	414,65104
450	450,23583
500	478,70190
$y = 0,75852x + 106,19513$	
$r = 0,99764$	



Gambar 5.7 Kurva Baku Penetapan Kadar Kafein

Tabel 5.12 Data Penetapan Kadar Kafein pada Sampel Teh Hitam

Replikasi Sampel	Penimbangan Sampel (g)	Konsentrasi (ppm) (x)	Luas Area (AUC) (y)
---------------------	---------------------------	--------------------------	------------------------

1	0,0100	1000	2871,51172
2	0,0101	1010	8010,48682
3	0,0101	1010	8847,51367
Rata-rata	0,0100		6576,50407

Berdasarkan data hasil percobaan penetapan kadar diperoleh rata-rata kadar kafein dalam 0,0101 gram pada sampel teh hitam dipasaran dengan tiga kali replikasi adalah 6,57650 % (%b/b).

BAB 6. PEMBAHASAN

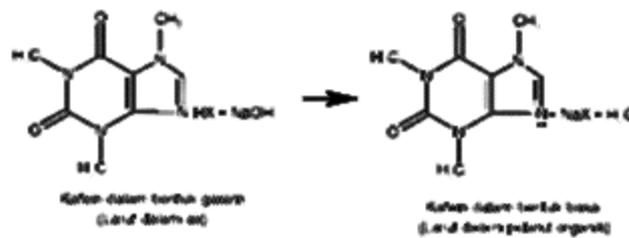
Penelitian ini menggunakan sampel produk teh hitam dari PTPN XII Lawang, Jawa Timur yang bertujuan untuk mendapatkan hasil kondisi optimum pada sistem KCKT fase terbalik (laju alir, fase gerak, dan panjang gelombang) agar dapat memisahkan senyawa kafein dengan senyawa lain yang terkandung pada sampel teh hitam secara selektif dan cepat, serta kondisi optimasi yang terpilih memenuhi persyaratan validasi metode analisis sehingga dapat digunakan untuk menentukan kadar kafein pada sampel produk teh hitam dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik.

Dasar pemilihan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik pada penelitian ini adalah karena analisis kafein dalam sampel produk teh hitam termasuk analisis senyawa multikomponen. Dikatakan demikian karena produk teh hitam, tidak hanya mengandung senyawa kafein, namun juga senyawa minyak atsiri, polisakarida, asam amino, lipid, vitamin (seperti vitamin C), kuersetin, naringenin, dan polifenol (Scoparo dkk., 2016). Oleh karena itu

dibutuhkan suatu metode yang dapat memisahkan senyawa kafein dengan senyawa-senyawa lainnya dan sekaligus dapat mengkuantifikasinya pada tahap penetapan kadar.

Pada penelitian ini terlebih dahulu dilakukan tahap penyiapan ekstrak kafein pada bubuk teh hitam. Tahap ekstraksi kafein menggunakan metode ekstraksi infusa karena memiliki beberapa keuntungan yaitu pelarut yang digunakan murah, prosesnya cepat, dan sederhana (Warsiati., Wijasih., Febriani and Ayu, 2010). Sampel yang digunakan berupa bubuk teh hitam yang dihaluskan menjadi serbuk yang bertujuan untuk memperluas bidang kontak antara sampel dan pelarut ekstraksi. Pengecilan ukuran partikel berpengaruh terhadap jumlah senyawa yang akan terekstrak. Semakin kecil ukuran partikel sampel yang di ekstrak, maka luas permukaan kontak dengan pelarut semakin besar sehingga senyawa yang sifat kepolarannya sama dengan pelarut lebih optimal terekstrak atau tertarik (Makanjuola, 2017). Ekstrak kafein diperoleh dengan menyaring larutan teh hitam menggunakan kertas saring yang sebelumnya telah diseduh. Kemudian dipisahkan dengan corong pisah dan ditambahkan kalsium karbonat dan kloroform. Kalsium karbonat berfungsi untuk memutuskan ikatan kafein dengan senyawa lain, sehingga senyawa kafein akan ada dalam basa bebas (Maramis, Citraningtyas and Wehantouw, 2013). Kafein dalam basa bebas tadi kemudian akan diikat oleh kloroform, karena kloroform merupakan pelarut pengestraksi yang tidak dapat bercampur dengan pelarut semula (Suriani, 1997). Kemudian dilakukan pengocokan sehingga terjadi kesetimbangan konsentrasi zat yang diekstraksi pada dua lapisan yang terbentuk. Lapisan bawahnya diambil (fase kloroform) dan diuapkan dengan *waterbath*. Kloroform tadi akan menguap, sehingga hanya ekstrak kafein yang tertinggal (Irawati, Styawan and Nurhaini, 2018).

Proses preparasi sampel dilakukan dengan menggunakan larutan NaOH 10 N untuk mengubah kafein dalam sampel menjadi kafein berbentuk lebih basa sehingga dapat semakin larut dalam pelarut kloroform. Reaksi dapat dilihat pada Gambar 6.1.



Gambar 6.1 Reaksi Pelepasan Kafein dari Bentuk Garam Menjadi Bentuk Basa

Pada penelitian ini sebelum dilakukan validasi metode analisis dan penetapan kadar kafein, terlebih dahulu melakukan serangkaian tahap optimasi kondisi instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Optimasi laju alir dilakukan dengan cara menginjeksikan satu konsentrasi larutan baku kafein konsentrasi 500 ppm menggunakan variasi kecepatan alir 1,0; 1,2 dan 1,4 mL/menit. Pada kecepatan alir 1,0 mL/menit menghasilkan nilai *symmetry* dan plat teori (N) yang lebih besar serta waktu retensi yang lebih cepat. Sedangkan pada variasi kecepatan alir 1,2 dan 1,4 nilai *symmetry* dan plat teori (N) lebih kecil serta waktu retensinya lebih lama karena tekanan dari pompa yang meningkat menyebabkan analit tertahan pada kolom sehingga lebih lama terelusi. Penyebab tekanan pompa yang meningkat dikarenakan beban dari fase gerak yang membawa analit menjadi lebih besar sehingga menyebabkan peningkatan dari tekanan pompa KCKT. Sehingga dipilih laju alir 1,0 mL/menit karena menghasilkan nilai N 3244 dimana telah memenuhi syarat nilai $N > 2000$ pada larutan standar kafein 500 ppm (Tabel 5.1) (A. C. Moffat *et al.*, 2012).

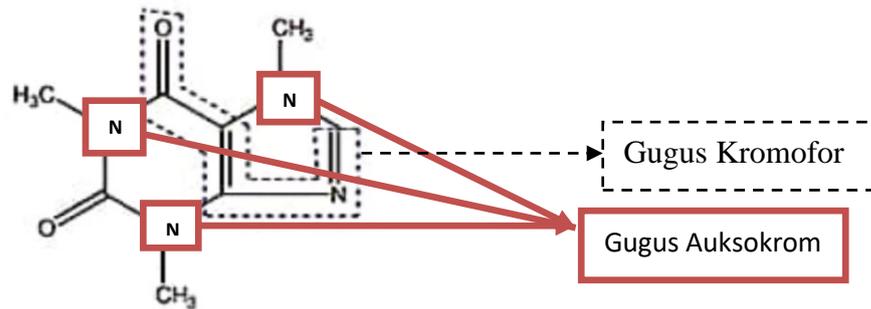
Berdasarkan hasil analisis optimasi fase gerak dengan larutan standar kafein 500 ppm pada panjang gelombang 272 nm menggunakan beberapa komposisi dan perbandingan fase gerak sehingga diperoleh komposisi fase gerak yang baik untuk analisis sampel teh hitam di pasaran menggunakan KCKT fase terbalik. Komposisi fase gerak pertama yang dicoba adalah seperti penelitian Denis Yulius, (2018) yaitu metanol : *aquabidestilata*. Berbagai variasi komposisi fase gerak telah dicoba untuk mendapatkan bentuk kromatogram yang baik dan waktu retensi yang

pendek adalah (i) 50:50 (v/v), (ii) 70:30 (v/v), dan (iii) 60:40 (v/v) (Gambar a 5.1). Namun profil kromatogram yang didapat belum memberikan profil kromatogram yang baik meskipun waktu retensi yang dihasilkan < 10 menit.

Komposisi fase gerak kedua yang dicoba adalah seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Zigelaet *al.*, (2020) adalah campuran metanol : *aquabidestilata* : asam asetat glasial 2% (50:48:2). Pemilihan fase gerak tersebut didasarkan pada kondisi kromatografi partisi fase terbalik, karena senyawa analit kafein bersifat polar sehingga untuk mengelusnya dengan cepat digunakan fase gerak yang polar sesuai senyawa analit. Pada komposisi fase gerak ini diperoleh waktu dengan kepolaran retensi sebesar 2,00. Tetapi profil kromatogram yang dihasilkan belum cukup bagus, karena puncak kromatogramnya melebar (Gambar 5.1 b).

Menurut Najma Sultanaet *al.*, (2009) asetonitril dan metanol dapat mengurangi *tailing factors* serta dapat menghasilkan durasi analisis yang lebih cepat sehingga pada optimasi fase gerak yang ketiga menggunakan komposisi fase gerak campuran asetonitril : metanol : *aquabidestilata*. Telah dilakukan percobaan dengan variasi perbandingan yang berbeda yaitu (i) 85:5:10, (ii) 90:5:5, dan (iii) 80:5:15. Dari ketiga variasi perbandingan yang telah dilakukan, pada perbandingan 80:5:15 didapatkan kromatogram yang bagus yaitu *peak* yang dihasilkan tajam dan hanya muncul 1 *peak* serta menghasilkan durasi analisis yang lebih cepat yaitu pada *retention time* 1,49 menit (Gambar 5.1 c).

Pada penentuan panjang gelombang maksimum ini dilakukan untuk mendapatkan panjang gelombang dengan serapan maksimum dari senyawa kafein. Analisis senyawa menggunakan instrumen KCKT memerlukan panjang gelombang dimana suatu senyawa dapat memberikan absorbansi maksimum untuk dibaca pada detektor UV pada sistem KCKT sehingga diharapkan semua kadar kafein dalam sampel dapat terdeteksi oleh detektor UV (Denis Yulius, 2018).



Gambar 6.2 Struktur Molekuler Kafein ($C_8H_{10}N_4O_2$) serta Profil Gugus Kromofor dan Auksokrom.

Penentuan panjang gelombang dilakukan menggunakan instrumen spektrofotometer UV, dilakukan dengan cara pengukuran serapan larutan standar kafein konsentrasi 100 ppm, 300 ppm, dan 500 ppm diukur pada panjang gelombang 200-400 nm, dan kafein memberikan serapan tertinggi pada panjang gelombang 272 nm (Gambar 5.2.3)(Fajriana and Fajriati, 2018). Berdasarkan teori panjang gelombang maksimum kafein adalah 273 nm (A . C . Moffat *et al.*, 2012). Pergeseran panjang gelombang yang terjadi pada senyawa kafein adalah 1 nm, sehingga panjang gelombang yang diperoleh pada penelitian ini dapat diterima menurut Snyder *et al.*, (2010), disebutkan bahwa pengujian panjang gelombang maksimum dapat digunakan apabila serapan maksimum tersebut tepat atau dalam batas 3 nm dari panjang gelombang yang ditentukan (Snyder *et al.*, 2010).

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mengukur serapan kafein dalam blanko pelarut metanol dan *aquabidestilata* (50:50) menggunakan instrumen spektrofotometer UV. Kafein memiliki gugus kromofor dan auksokrom pada strukturnya (Gambar 6.2) sehingga dapat memberikan serapan pada daerah sinar ultraviolet. Dimana pada konsentrasi 100 ppm menghasilkan absorbansi 1,5, konsentrasi 300 ppm menghasilkan absorbansi 2,9, sedangkan pada konsentrasi 500 ppm menghasilkan absorbansi tertinggi yaitu 5,3. Panjang gelombang hasil pengukuran dapat digunakan apabila besarnya lebih kurang 3 nm terhadap panjang gelombang teoritis kafein yaitu 273 nm (Snyder *et al.*, 2010). Hasil spektrum serapan larutan kafein menunjukkan bahwa ketiga seri

konsentrasi memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 272 nm sehingga pada analisis selanjutnya panjang gelombang tersebut digunakan untuk pengukuran larutan baku kafein maupun sampel teh hitam pada sistem KCKT.

Berdasarkan hasil optimasi kondisi KCKT yang telah dilakukan menggunakan larutan standar kafein konsentrasi 500 ppm diperoleh kondisi optimum yaitu laju alir 1,0 mL/menit, fase gerak asetonitril : metanol : *aquabidestilata* (80:5:15), dan panjang gelombang 272 nm.

Salah satu parameter yang digunakan pada uji kesesuaian sistem yaitu nilai standar deviasi relatif (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi. Injeksi berulang dari larutan standar digunakan untuk memastikan persyaratan dari presisi. Data 5 kali injeksi berulang digunakan untuk menghitung RSD, bila persyaratan 2,0% atau kurang, bila menggunakan persyaratan lebih dari 2,0% maka menggunakan data 6 kali injeksi berulang (USP, 2016). Pada uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menginjeksikan satu konsentrasi larutan standar kafein 500 ppm dengan pelarut asetonitril : metanol : *aquadestilata*(80:5:15) sebanyak 6 kali replikasi pada kondisi KCKT terpilih menunjukkan waktu keterulangan waktu retensi dan area yang memenuhi persyaratan yaitu nilai RSD <2% untuk keterulangan waktu retensi menghasilkan RSD 0,253% dan keterulangan area menghasilkan RSD 0,3% (Tabel 5.3).

Perlakuan validasi metode analisis yang pertama kali dilakukan adalah parameter selektivitas, uji selektivitas merupakan kemampuan fase diam untuk memisahkan 2 komponen (komponen 1 dan komponen 2) sehingga nantinya dapat ditentukan bahwa dalam suatu matriks identitas puncak analit senyawa kafein dengan senyawa lain dapat terpisah dengan baik. Dalam penelitian ini matriks yang dimaksud adalah ekstrak teh hitam, dimana selektivitas ditentukan dengan nilai resolusi. Nilai resolusi akan menunjukkan apakah dua puncak kromatogram yang bersebelahan dapat terpisah atau tidak. Untuk memenuhi kriteria selektivitas, suatu metode dipersyaratkan untuk memiliki nilai resolusi >1,5 (Synder *et al.*, 2010). Pada penelitian ini nilai resolusi ditentukan dengan melihat kromatogram sampel dan standar, namun pada kromatogram Gambar 5.4a dan b dimana hanya

muncul 1 *peak* saja artinya menunjukkan bahwa selektif pada senyawa kafein sa yang ditunjukkan dari *peak* pada *retention time* (t_R) yang sama dengan nilai resolusi = 0. Sedangkan pada gambar c dan d menunjukkan adanya 2 *peak* pada hasil kromatogramnya artinya terjadi pemisahan yang selektif antara senyawa kafein dengan analit lain yang ditunjukkan dengan *retention time* (t_R) yang sama dengan masing-masing nilai resolusinya 3,54 dan 2,87. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa kafein mampu di analisis dengan metode tersebut (Tabel 5.4).

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 arah garis (Harmita, 2004). Tahapan berikutnya melakukan tahap penentuan linieritas dengan membuat 8 konsentrasi yang berbeda dari larutan standar kafein pada rentang konsentrasi 250,5 ppm – 601,2 ppm. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan persamaan regresi $y = 2,01914x - 219,97226$ dengan nilai $r = 0,9995$. Linieritas menunjukkan kemampuan suatu metode untuk memperoleh seberapa proporsional kurva baku yang menghubungkan respon (y) dengan konsentrasi (x). Dari kurva baku diperoleh persamaan kurva baku $y = bx + a$, dimana b adalah nilai kemiringan (*slope*), a adalah intersep dan koefisien korelasi (r). Linieritas dilakukan dengan mengukur konsentrasi larutan seri kurva baku dengan minimal enam konsentrasi (Miller, 2010). Hal ini menunjukkan bahwa persamaan kurva baku linieritas dapat digunakan untuk menentukan nilai atau kadar sampel. Selain itu, harus menentukan parameter linieritas yang lainnya yaitu menghitung nilai V_{x0} . Pada perhitungan V_{x0} diperoleh nilai V_{x0} dari kurva baku kafein adalah $V_{x0} = 28,381\%$ data lengkapnya tertera pada lampiran 2 (Emawati, Yani and Idar, 2017).

Menurut Harmita (2014), batas deteksi adalah jumlah analit terkecil dalam sampel yang masih dapat terdeteksi dan memberikan respon yang signifikan. Sedangkan batas kuantitasi adalah kuantitasi terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dihitung dengan rumus $LOD = 3 \times SD/slope$ dan batas kuantitasi dihitung dengan rumus $LOQ = 10 \times SD/slope$ dimana SD adalah standar deviasi residual dari kurva

kalibrasi dan *slope* merupakan nilai sensitifitas dari metode analisis, semakin besar nilai kemiringan maka semakin besar nilai kesensitifan metode tersebut (D. Apriyanti, *et al.*, 2013). Penetapan LOD dan LOQ pada penelitian ini dilakukan dengan cara membuat delapan seri konsentrasi di bawah seri konsentrasi kurva baku linieritas. Berdasarkan hasil penelitian tabel 5.5 didapatkan nilai batas deteksi pada penelitian ini yaitu $LOD = 8,78525 \text{ ppm}$ dan nilai batas kuantitasi yaitu $LOQ = 29,28418 \text{ ppm}$ (Lampiran. 3) (M. Nita, 2018).

Selanjutnya melakukan tahap penentuan presisi. Uji presisi dilakukan dengan metode *repeatability*. Penentuan *repeatability* dilakukan dengan cara menganalisis 3 larutan sampel yang telah di adisi standar kafein konsentrasi 80%, 100%, 120% lalu masing-masing konsentrasi di replikasi sebanyak 3 kali penginjekan pada KCKT. Metode analisis dikatakan presisi jika memberikan nilai standar deviasi relatif (RSD) atau nilai koefisien korelasi (KV) kurang dari 2% yang dihitung sebagai presentase dengan cara melakukan pembagian antara nilai standar deviasi dengan nilai rata-rata hasil pengulangan dari setiap konsentrasi. Berdasarkan hasil presisi dari penelitian nilai KV yang diperoleh pada konsentrasi 80% adalah sebesar 0,56517% (Tabel 5.7), konsentrasi 100% adalah sebesar 0,59043% (Tabel 5.8), dan pada konsentrasi 120% adalah sebesar 1,04528% (Tabel 5.9). Nilai yang diperoleh telah memenuhi syarat keberterimaan uji presisi karena masih berada dibawah nilai yang dipersyaratkan. Sehingga hasil tersebut menunjukkan bahwa metode analisis uji presisi yang telah dilakukan memiliki presisi yang baik (Harmita, 2004).

Kemudian dilakukan penentuan akurasi untuk mengetahui kedekatan antara nilai terukur dengan nilai sebenarnya yang ditunjukkan dengan nilai perolehan kembali (*recovery*). Terdapat dua metode yang dapat digunakan dalam menentukan persen perolehan kembali, metode yang pertama yaitu simulasi (*spike placebo*) dan metode kedua adalah metode penambahan baku (*standard addition*). Metode penambahan baku dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah tertentu konsentrasi analit ke dalam larutan sampel. Nilai persen perolehan kembali (*recovery*) yang dapat diterima menurut *Food and Drug Administration* (FDA)

adalah antara rentang 80-120% (Harahap, 2009). Berdasarkan Harmita (2004), untuk konsentrasi analit dalam matriks 100%, maka rentang *recovery* yang dipersyaratkan adalah pada rentang 95%-102%. Nilai perolehan kembali didapatkan dengan mengukur 3 larutan sampel ekstrak teh hitam dari uji presisi yang di adisi larutan standar kafein dengan 3 konsentrasi yang berbeda yaitu 80%, 100%, 120%. Masing-masing konsentrasi di replikasi sebanyak 6 kali selanjutnya dilihat nilai akurasi. Dari data penentuan akurasi pada tabel 5.10 diperoleh data rata-rata perolehan kembali untuk masing-masing konsentrasi adalah 99,25% ; 98,67% ; 99,60%. Dari hasil konsentrasi yang didapat memenuhi persyaratan keberterimaan rentang % *recovery* sehingga nilai akurasi sudah terpenuhi (Harmita, 2004).

Setelah semua parameter validasi memenuhi persyaratan maka dapat dikatakan metode yang telah dilakukan pada penelitian ini valid, sehingga dapat digunakan untuk analisis penetapan kadar senyawa kafein pada sampel sebelumnya teh hitam dipasaran. Metode penetapan kadar dilakukan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik dengan pelarut metanol : aquadestillata (50:50) pada panjang gelombang 272 nm. Penetapan kadar dilakukan dengan menginjeksikan 3 kali replikasi larutan sampel dengan rata-rata konsentrasi 1010 mg. Berdasarkan hasil penelitian pada penginjeksian larutan sampel yang pertama luas area yang dihasilkan 2871,51172 ppm, injeksi kedua luas area 8010,48682 ppm, injeksi ketiga luas area 8847,5136 ppm. Terdapat selisih yang signifikan pada hasil luas area penginjeksian pertama bila dibandingkan dengan hasil nilai luas area penginjeksian kedua dan ketiga, hal ini disebabkan adanya *human error* yaitu peneliti kurang menghomogenkan larutan sampel yang akan diinjeksikan ke sistem KCKT. Jika teh dikonsumsi melebihi 2 cangkir per hari maka menimbulkan resiko yang buruk terhadap kesehatan peminumnya, sebab teh mengandung 40-100 mg kafein per cangkirnya. Khusus pada teh hitam kandungan kafein pada teh dalam 100 gram kurang lebih 2,5-4,5% kafein atau kandungan kafein berkisar 20-90 mg (Muhamad and Akbar, 2017). Berdasarkan Surat Keputusan Kepala Badan POM No.HK.00.05.23.3644 yaitu batas maksimum konsumsi kafein per hari 50 mg – 150 mg. Kadar senyawa

kafein yang diperoleh adalah 6,57650% (%b/b), data lengkapnya ada pada tabel 5.12 dan lampiran 4. Berdasarkan sampel produk teh hitam dari PTPN XII Lawang, Jawa Timur yang telah dilakukan penetapan kadar, sampel tersebut memenuhi persyaratan yang ditetapkan oleh BPOM. Kafein yang dikonsumsi secara berlebihan dapat menimbulkan efek farmakologi. Efek tersebut dapat mempengaruhi sistem saraf pusat, jantung, *insomnia*, *palpitasi*, ginjal, *gastrointestinal* serta sistem pernafasan (Vuong Quan, *et al.*, 2013). Akan tetapi jika kafein dikonsumsi dalam kadar yang sesuai maka kafein berguna sebagai anti hipertensi, anti inflamasi, anti obesitas, *hypocholesterolemic*, dan anti diabetes (El-Shawawi, *et al.*, 2012).

Dari hasil validasi metode analisis yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa metode KCKT fase terbalik yang digunakan untuk validasi metode analisis dan penetapan kadar kafein pada sampel teh hitam dari PTPN XII Lawang, Jawa Timur adalah valid.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan :

1. Kondisi optimum kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan menggunakan fase diam kolom *poroshell* 120 EC C-18 (4,6 x 150 mm) untuk validasi metode analisis dan penetapan kadar kafein pada sampel teh hitam dari PTPN XII Lawang, Jawa Timur yaitu :

Laju alir = 1,0 mL/menit

Komposisi fase gerak = Asetonitril : Metanol : *Aquabidestilata*
(80:5:15)

Panjang Gelombang Analisis = 272 nm

2. Metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) fase terbalik untuk validasi metode analisis dan penetapan kadar kafein pada sampel teh hitam dari PTPN XII Lawang, Jawa Timur yang menggunakan fase diam kolom *poroshell* 120 EC C-18 (4,6X150 mm), laju alir 1,0 mL/menit, fase gerak asetonitril : metanol : *aquabidestilata* (80:5:15), dan panjang gelombang 272 nm telah memenuhi persyaratan keberterimaan validasi metode analisis yaitu Uji Kesesuaian Sistem (UKS), selektivitas, linieritas, batas deteksi (LOD), batas kuantitasi (LOQ), akurasi, dan presisi sehingga metode tersebut dapat digunakan untuk menetapkan kadar senyawa kafein dalam sampel teh hitam.
3. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa diperoleh rata-rata kadar kafein dalam 10 mg sampel produk teh hitam dari PTPN XII Lawang, Jawa Timur adalah sebesar 6,57650% b/b atau jika dibuat dalam satuan miligram yaitu 65,76504 mg. Hal ini sesuai dengan ketentuan yang dipersyaratkan oleh Badan POM yaitu yang tertuang pada Surat Keputusan No.HK.00.05.23.3644 tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan yaitu batas konsumsi kafein maksimum 50 mg sampai 150 mg per hari.

7.2 Saran

Kepada peneliti selanjutnya perlu dilakukan optimasi kondisi kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) fase terbalik lebih baik lagi seperti optimasi laju alir dan optimasi fase gerak agar kondisi yang terpilih tetap stabil dalam analisis yang rutin jika dilakukan pada sampel yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidi, S., Gilani, U. and Zehra, R. (2020) 'Extraction and analysis of caffeine from various brands of tea leaves marketed in Pakistan', 9(1), pp. 9–10.
- A . C . Moffat , M . D . Osselton , B . Widdop , J . Watts (Editors); Clarke ' s Analysis of Drugs and Poisons , Fourth Edition . (2011) Pharmaceutical Press , London , UK , 2473 pp ., ISBN 978-0853697114 .' (2012), (2011), p. 2473.
- Ahmad, A. and Khalid, N. (2013) 'Chemical composition and sensory evaluation of tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Pakistan', (May 2014).
- Angelo Antonio D'Archivio, M. A. (2014). Prediction of the retention of s-triazines in reversed-phased high-performance liquid chromatography under linear gradient-elution conditions. *Journal of Separation Science*, Volume 37 (Issue 15).
- Anonim (2008). Sixty-Fourth Report On Export Of Tea. (<http://rajyasabha.nic.in>, diakses 20 Maret 2020).
- Anonim. Farmakope Indonesia Edisi V 2014, Jakarta :Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2014
- Anonim, 1995, Farmakope Indonesia, Edisi IV , 254, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Apriyanti, D., Indria Santi, V. and Dianinayati Siregar, Y. (2013) 'Pengkajian Metode Analisis Amonia Dalam Air Dengan Metode Salicylate Test Kit', *Jurnal Ecolab*, 7(2), pp. 60–70. doi: 10.20886/jklh.2013.7.2.60-70.
- Arwangga, A.A., Asih, I.A.R.A., Sudiarta, I.W. 2016. Analisis Kandungan Kafein pada Kopi di Desa Sesaot Narmada Menggunakan Spketrofotometri UV-VIS. *Jurnal Kimia*, 10 (1), pp. 110-114.
- Association of Official Analytical Chemists, 2013. AOAC Appendix K : Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, pp. 1-32.
- Azim Md. Sabir, M. M. (2013). HPLC method development and validation: A review. *International Research Journal of Pharmacy*, IV, 39-46.

- Babu, A. V. (2017) 'ISSN : 2320-2831 Open Access HPLC and LCMS – A review and a recent update PERFORMANCE', 6(3), pp. 555–567.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2004. Ketentuan pokok pengawasan suplemen makanan. Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 13.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2012, Penerapan Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik, BPOM, Jakarta.
- Badan Pusat Statistik, 2018, Statistik Teh Indonesia. Badan Pusat Statistik Republik Indonesia, Jakarta.
- Carlioni, P., Tiano, L., Padella, L., Bachetti, T., Customu, C., Kay, A., Damiani, E. 2013. Antioxidant Activity of White, Green, and Black Tea Obtained From the Same Tea Cultivar. *Food Research International*, 53, pp. 900-908
- Chaugule, A. *et al.* (2019) 'Extraction of Caffeine', 6(9), pp. 11–19.
- Chen, J. *et al.* (2001) 'Neuroprotection by Caffeine and A 2A Adenosine Receptor Inactivation in a Model of Parkinson ' s Disease', 21, pp. 2–7.
- Clarke, E.G.C., 1969, Isolation and Identification of Drugs, 465, The Pharmaceutical Press, London
- Clara, Maria. 2018. Validasi Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fase Terbalik pada Penetapan Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk Murni Robusta Merek "X". Skripsi. Program Studi Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Cristian Hernandez, A. A. (2017). Polyphenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of extract from *Nephelium lappaceum* L. *Asian Journal of Tropical Medicine*, X (12), 1201-1205.
- Cushnie, T. and Lamb, A. J. (2017) 'Antimicrobial activity of flavonoids', (November). doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.
- D'Archivio, A. A., Maggi, M. A. and Ruggieri, F. (2014) 'Prediction of the retention of s-triazines in reversed-phase high-performance liquid chromatography under linear gradient-elution conditions.', *Journal of separation science*, 37(15), pp. 1930–1936. doi: 10.1002/jssc.201400346.

- Davies, M. J. *et al.* (2003) 'Black tea consumption reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolemic adults.', *The Journal of nutrition*, 133(10), pp. 3298S-3302S. doi: 10.1093/jn/133.10.3298S.
- Devi, D. *et al.* (2015) 'Pengaruh Suhu dan Waktu Ekstraksi terhadap Kadar Kafein dalam Teh Hitam', 4(2), pp. 105–108.
- Denis, Yulius. 2018. Penetapan Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk Murni Robusta Merek "X" dengan Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fase Terbalik. Skripsi. Program Studi Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Departemen Kesehatan RI, 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan: Jakarta Hal 5,9,10,11,12.
- Departemen Kesehatan RI, 1995. Farmakope Indonesia Edisi IV. Departemen Kesehatan RI: Jakarta Hal 7.
- Dong, M. W. (2006) 'Modern HPLC for Practicing Scientists', *Modern HPLC for Practicing Scientists*, pp. 1–286. doi: 10.1002/0471973106.
- El-Shawawi. M.S., Hamza. A., Bahaffi. S.O., Al-Sibaai. A.A., Abduljabbar. T.N. Analysis of Some Selected Cathecins and Caffeine In Green Tea by High Performance Liquid Chromatography. *Food Chemistry*, 134, (2012), pp 2268-2275.
- Emawati, E., Yani, N. S. and Idar, I. (2017) 'Analisis Kandungan Fosfor (P) Dalam Dua Varietas Kubis (*Brassica oleracea*) Di Daerah Lembang Bandung', *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 1(1), p. 08. doi: 10.15416/ijpst.v1i1.10426.
- Engelhardt, Ulrich H. 2010. Chemistry of Tea, *Comprehensive Natural Products II*. 3. 999-1032
- Eunike., 2010., Hebal Indonesia Berkhasiat., PT. Trubus Swadaya., Jakarta.
- Fajriana, N. H. and Fajriati, I. (2018) 'Analisis Kadar Kafein Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) pada Variasi Temperatur Sangrai', *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 3(02), pp. 148–162.

- Fathoni, Ahmad. 2015. Analisa Secara Kualitatif Dan Kuantitatif Dalam Kopi Bubuk Lokal Yang Beredar Di Kota Palembang Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Penelitian mandiri. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Bhakti Pertiwi Palembang.
- Febri Annuryanti, M. Z. (2018). (2018) 'Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia Vol. 5 No. 1 Juli 2018 30', 5(1), pp. 30–35.
- Fangfang, S., Y. Yuan, and S. Fang, Denaturing reversed-phase HPLC using a mobile phase containing urea for oligodeoxynucleotide analysis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2014. 33(7): p. 481-8.
- Gandjar, Gholib Ibnu & Abdul Rohman. (2012). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Greyling, A. *et al.* (2014) 'The effect of black tea on blood pressure: a systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials.', *PloS one*, 9(7), p. e103247. doi: 10.1371/journal.pone.0103247.
- Harahap, Y. and Alia, N. (2009) 'Validasi Metode Analisis Rebamipid Dalam Plasma In Vitro Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-', VI(3), pp. 156–167.
- Harmita. Dan, M. and Perhitungannya, C. (2004) 'Petunjuk Pelaksanaan Validasi', I(3), pp. 117–135.
- Hari Susanti, N. P. (2019) 'Perbandingan Metode Spektrofotometri UV Dan HPLC pada Penetapan Kadar Kafein dalam Kopi', 4(Suppl 1), pp. 28–33.
- Harmita, 2009. *Analisis Fisikokimia: Kromatografi*
- Hartoyo, Arif. 2003. *Teh dan Khasiatnya bagi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius, hal. 11, 13.
- Harvey, D, 2000, *Modern Analytical Chemistry*, The McGraw-Hill Companies, Inc., USA, pp. 110,548,550,579, 580, 584
- Helwandi, I. (2016) 'Validasi Metode Spektrofotometri UV-Vis Analisis Tiga Panjang Gelombang Untuk Penetapan Kadar Tablet Prednison Yang Mengandung Zat Pewarna', *Skripsi*, p. 101. Available at: http://repository.unair.ac.id/56266/13/FF_KF_52-16_Hel_v.pdf.

- Irawati, D., Styawan, A. A. and Nurhaini, R. (2018) 'Penetapan Kadar Kafein Pada Teh Oolong (*Camellia Sinensis*) Dengan Metode Titrasi Bebas Air', *Analisi*, p. 6.
- Januar, M. *et al.* (2014) 'Analisis Pengendalian Kualitas Pada Proses Pengeringan Teh Hitam Dengan Metode Six Sigma : Studi Kasus Di PTPN XII (Persero) Wonosari, Lawang Analysis of Quality Control in Black Tea Drying Process with Six Sigma Methods : Case Study in PTPN XII (Pers', 15(1), pp. 37–46.
- Jerz, G., *et al.*, Separation of amaranthine-type betacyanins by ion-pair high-speed countercurrent chromatography. *J Chromatogr A*, 2014. 1344: p. 42-50.
- Julizan, N. *et al.* (2019) 'Validasi Penentuan Aktifitas Antioksidan dengan Metode DPPH (Validation Of Antioxidant Activity Determination By DPPH Methode)', 1.
- Juniaty, Towaha, Ballitri . 'perkebunan_warta-vol19No3-2013-4.pdf' (2012).
- Kazakevich, Y., dan LoBrutto, R., 2007, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, pp. 25, 35, 145, 146, 161, 192.
- Kimia, P. S., Sains, F., Kristen, U., Wacana, S., & Diponegoro, G. Y. J. (2012). Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Untuk Penetapan Kadar Asam Galat , Kafein Dan Epigalokatekin Galat Pada Beberapa Produk. 32(4), 362–369.
- Kirkland, L. R. S. J. J. (2010) *Introduction to Modern Liquid Chromatography Second Edition*.
- Kolahdouzan, M. and Hamadeh, M. J. (2017) 'The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases.', *CNS neuroscience & therapeutics*, 23(4), pp. 272–290. doi: 10.1111/cns.12684.
- Kumalaningsih, S. (2007). Pengaruh Kadar Tanin yang Terdapat di dalam Teh. Tersedia pada <http://antioxidantcentre.com/index2.php>. (diakses 28 Oktober 2020).
- Kustamiyati, B., 2006. Prospek Teh Indonesia Sebagai Minuman. <http://www.lppi.go.id>. [diakses pada 9 April 2020].

- Lababidi, S. and Schrader, W. (2014) 'Online normal-phase high-performance liquid chromatography/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: effects of different ionization methods on the characterization of highly complex crude oil mixtures.', *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 28(12), pp. 1345–1352. doi: 10.1002/rcm.6907.
- Larsson, S. C., Virtamo, J. and Wolk, A. (2013) 'Black tea consumption and risk of stroke in women and men.', *Annals of epidemiology*, 23(3), pp. 157–160. doi: 10.1016/j.annepidem.2012.12.006.
- Lipka, E. And C. Vaccher, Quantitative analysis of drugs in biological matrices by HPLC hyphenated to fluorescence detection. *Bioanalysis*, 2015. 7(6):p. 743-762.
- Malviya, R. and Sharma, P. (2014) 'Journal of Global Pharma Technology', (May).
- Malviya, R., *et al.*, High performance liquid chromatography: A short review. Vol. 2. 2010. 22-26.
- Maramis, R. K., Citraningtyas, G. and Wehantouw, F. (2013) 'Analisis Kafein Dalam Kopi Bubuk Di Kota Manado Menggunakan Spektrofotometri UV-VIS', 2(04).
- Maughan, R. J. and Griffin, J. (2003) 'Caffeine ingestion and fluid balance: a review.', *Journal of human nutrition and dietetics: the official journal of the British Dietetic Association*, 16(6), pp. 411–420. doi: 10.1046/j.1365-277x.2003.00477.x.
- Ms. R. R. Shinde, Prof. N. H. Shinde "Extraction of Caffeine from Coffee and preparation of Anacin drug", *International Journal of Engineering Research and Technology*. ISSN 0974-3154 Volume 10, Number 1 (2017).
- Muhamad, A. and Akbar, I. (2017) 'Efektifitas Penurunan Kadar Kafein pada Teh Hitam dengan Metode Ekstraksi', 4(2), pp. 100–102.
- Ningtyas, T. S. and Fajriati, I. (2019) 'Analisis Pemanis Buatan Natrium Siklamat pada Minuman Ringan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi', 001(01), pp. 30–35.

- O'Fágáin, C., Cummins, P. M. and O'Connor, B. F. (2011) 'Gel-filtration chromatography.', *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 681, pp. 25–33. doi: 10.1007/978-1-60761-913-0_2.
- Orrú, M. *et al.* (2013) 'Psychostimulant pharmacological profile of paraxanthine, the main metabolite of caffeine in humans.', *Neuropharmacology*, 67, pp. 476–484. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.11.029.
- Pan, H., Gao, Y. and Tu, Y. (2016) 'Mechanisms of Body Weight Reduction by Black Tea Polyphenols.', *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(12). doi: 10.3390/molecules21121659.
- Pasar, D. I. and Dunia, T. E. H. (2012) 'Daya Saing Ekspor Teh Indonesia'.
- Pembimbing, D. and Kimia, J. (2015) 'Impact Of Extraction Conditions Of Caffeine'
- Peris-vicente, J., Esteve-romero, J. and Carda-broch, S. (2015) 'Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview', pp. 1–52.
- Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Pradeep S., G. N. Rameshaiah, Hadagali Ashoka, Chandraprasad M.1 'Caffeine Extraction And Characterization' (2015), 7(9), pp. 16–19.
- Pusat Penelitian Teh dan Kina. (2008). Petunjuk teknis pengelolaan teh (p. 109). Gambung: Pusat Penelitian Teh dan Kina.
- Putra, E. D. E. L. U. X. (2004) 'Digitized by USU digital library 1', pp. 1–22.
- Rahim, A. A., Nofrizal, S. and Saad, B. (2014) 'Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column.', *Food chemistry*, 147, pp. 262–268. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.131.
- Rasheed, Z. (2019) 'Molecular evidences of health benefits of drinking black tea', 13(3), pp. 21–23.

- Rasyid, Roslinda., Sanjaya, Winaldi Fitra., Zulharmita. 2013. Penetapan Kadar Kofein Daun Kopi Kawa (*Coffea Robusta*, Lind). *Jurnal Farmasi Higea*, Vol. 5, No.2, pp.137-143.
- Robbers, E. James; Speedie, K. Marilyn; Tyler, E. Vavro, 1996, *Pharmacognosy and Biotechnology*, 182-185, Williams & Wilkins, USA.
- Rohdiana D. 2006. *Petunjuk Teknis Pengolahan Teh Edisi ke-2*. Bandung: Pusat Penelitian Teh dan Kina.
- Rohdiana, D. (2015) 'Teh ': Proses Karakteristik & Komponen Fungsionalnya. *Food Review Indonesia*, (August).
- Rohman, A., 2009, *Kromatografi Untuk Analisis Obat*, Graha Ilmu, Yogyakarta, pp. 111, 113, 115.
- Rondang Tambun, H. P. *et al.* (2016) 'Fenol Dari Lengkuas Merah Influence Of Particle Size , Time And Temperature To Extract Phenol', 5(4), pp. 53–56.
- Sanjayadi and Violita, L. B. (2020) 'Penetapan Kadar Tetrasiklin dalam Air Limbah dengan High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detector (HPLC-PDA)', *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 6(2), pp. 237–242. doi: 10.22487/j24428744.2020.v6.i2.15066.
- Scoparo Camila T. A4 - de Souza, Lauro M. A4 - Rattmann, Yanna D. A4 - Kiatkoski, Elaine C. A4 - Dartora, Nessada A4 - Iacomini, Marcello, C. T. A.-S. (2016) 'The protective effect of green and black teas (*Camellia sinensis*) and their identified compounds against murine sepsis', *Food research international*, v. 83, pp. 102-111–2016 v.83. doi: 10.1016/j.foodres.2016.02.011.
- Seger, C., Sturm, S. and Stuppner, H. (2013) 'Mass spectrometry and NMR spectroscopy: modern high-end detectors for high resolution separation techniques--state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations.', *Natural product reports*, 30(7), pp. 970–987. doi: 10.1039/c3np70015a.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Dolan, J.W., 2010. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*.

- Society, C. (2016) 'Total Contents of Phenols, Flab=vonoids, Tannin and Antioxidant Capacity of Selected Traditional Ethiopian Alcoholic Beverages', 30(1), pp. 27–37.
- Student, P. G. (2017) 'Extraction of Caffeine from Coffee and preparation of Anacin drug', 10(1), pp. 236–239.
- Sudaryat, Y. *et al.* (2015) 'Aktivitas antioksidan seduhan sepuluh jenis mutu teh hitam (*Camellia sinensis* (L .) O .Kuntze) Indonesia Antioxidant activity of ten grades of Indonesia black tea'.
- Sugihartini, N., Fudholi, A. and Pramono, S. (2014) 'Validation Method Of Quantitative Analysis Of Epigallocatechin Gallat By High Performance'.
- Sugiyono. (2014). *Statistika Untuk Penelitian*. Bandung: Penerbit CV ALFA BETA.
- Sundalian, Melvia; Tinggi, Sekolah; Indonesia, Farmasi; Nugrahani, Ilma
- Suprianto. (2014) 'Pengembangan Metode Penetapan Kadar Campuran Pemanis, Pengawet dan Pewarna secara Simultan dalam Sirup Esen dengan Menggunakan KCKT'. [Skripsi]. Medan. Universitas Sumatera Utara.
- Suriani., (1997), Analisis Kandungan Kofeina Dalam Kopi Instan Berbagai Merek yang Beredar di Ujung Pandang, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Syah, A.N.A., 2006, Taklukkan Penyakit dengan Teh Hijau, 60-87, Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Syarif, U. I. N. and Jakarta, H. (2014) Validasi Metode Penetapan Kadar Aliskiren dalam Plasma Darah secara In Vitro menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).
- Tea, G. (2017) 'Faktor determinan preferensi dan perilaku konsumsi teh hitam dan hijau', 14(3), pp. 198–208.
- Trease, Evans. 2002. *Pharmacognosy 15th Edition*. 302. W.B. Saunders, London.
- T. Sun, B.L. Pan, Y. Huo, S.M. Guan and Y. He. Technology, A. (2014) 'Isolation and Bioactivities of Main Functional Components in Tea', 26(8), pp. 2191–2198.

- Tulandi, G. P., Sudewi, S. and Lolo, W. A. (2015) 'Validasi Metode Analisis Untuk Penetapan Kadar Parasetamol Dalam Sediaan Tablet Secara', 4(4).
- Tugiyanti, E., & Susanti, E. (2017).Corresponding Author Email :November, 54–62.
- Udayana, J. F. (2019) 'Isolasi Kafein Dengan Metode Sublimasi dari Fraksi Etil Asetat Serbuk Daun Teh Hitam (*Camelia sinensis*)', 8(1), pp. 53–62.
- United States Pharmacopeia (USP) Convention. 2017. United States Pharmacopeia (USP) national Formulary 40 NF-35.
- United States Pharmacopeial Convention, 2014. The United States Pharmacopeia 37 –National Formulary 32 (USP37-NF32). 37th edition. Rockville USA : United States Pharmacopeial Convention Inc.
- Vare, S.R, O. F. *et al.* (2019) 'a Review : Development and Validation of Rp-Hplc Method for Quantitative Analysis of Pharmaceutical', 8(6), pp. 502–532. doi: 10.20959/wjpr20196-14926.
- Wardani, R. K. and Fernanda, M. A. H. F. (2016) 'Analisis Kadar Kafein Dari Serbuk Teh Hitam , Teh Hijau dan Teh Putih (*Camellia sinensis* L .)', 1(1), pp. 2015–2017.
- Warsiati., Wijasih., Febriani, A. and Ayu, R. K. W. (2010) 'Acuan Sediaan Herbal', *Acuan Sediaan Herbal*, pp. 65–67.
- Widyaningrum, N. 2013. Epigallocatechin – 3 –Galaate (EGCG) Pada daun Teh Hjiiau (*Camelia Sinensis* L.) Sebagai Anti Jerawat. Skripsi . Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Semarang. 66 pp.
- World Health Organization. (1997). Pemastian Mutu Obat: Kompendium Pedoman dan Bahan-bahan Terkait (Mimi V. Syahputri, Penerjemah.).Jakarta: EGC
- Vol, I., July, I. and Babu, A. V. S. (2017) 'ISSN : 2320-2831 Open Access HPLC and LCMS – A review and a recent update PERFORMANCE', 6(3), pp. 555–567.
- Vuong. Quan V., Golding. John B., Nguyen. Minh H, Roach. Paul D. Preparation of Decaffeinated and High Caffeine Powders From Green Tea. *Powder Technology*, 233, (2013), pp.169-175.

Yuwono, M. and Indrayanto, G. (2005) 'Validation of chromatographic methods of analysis.', *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology*, 32, pp. 243–259. doi: 10.1016/S0099-5428(05)32009-0.

Zhang, L.Z., Wang, D.L., Chen, W.X., Tan, X.D., Wang, P .C., 2012. Impact of Fermentation Degree on The Antioxidant Activity of Pu-erh Tea in vitro. *Journal Food Biochem.* 36 : 262–267

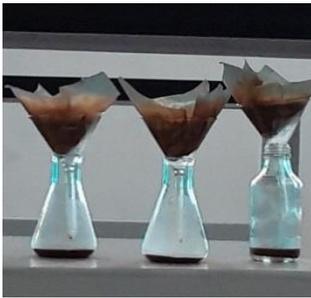
Lampiran. 2 Penyiapan Ekstrak



Penimbangan bubuk teh hitam



Penyeduhan bubuk teh hitam dengan aquadest 200 mL



Penyaringan infusa teh hitam



Replikasi 1, 2, 3 ekstraksi cair-cair menggunakan kloroform

Lampiran. 3Preparasi Sampel



Preparasi standar kafein dan sampel teh hitam



Larutan standar kafein dan sampel setelah di ultrasonik



Penyaringan standard an sampel menggunakan kertas saring *whatman* ukuran 0,45 μm

Lampiran. 4 Perhitungan V_{x0} Linieritas Standar Kafein

No	Kadar (ppm)	Area (mAU) (Y)	$Y_i = bx + a$	$(Y - Y_i)^2$
1.	250,5	286,88400	251,02581	1285,80979
2.	300,6	395,74413	304,93992	8245,40455
3.	350,7	475,51473	344,44713	1717,17870
4.	400,8	581,25429	396,81574	3400,77943
5.	450,9	699,91466	455,58352	59697,70600
6.	501	793,47499	501,92024	85004,17220
7.	551,1	888,94475	549,20263	115424,70800
8.	601,2	996,30296	602,37290	155180,89200
	$\Sigma = 3.406,8$			$\Sigma =$ 62.949,58133
$y = 219,97226x - 2,01914$ $r = 0,9995$ $V_{x0} = 0,11199 \%$				

$$Y = bx + a$$

$$= 219,97226x + 2,01914$$

$$\text{Rata-rata (X)} = \frac{3.406,8}{8}$$

$$= 425,85$$

$$S_y = \sqrt{\frac{\Sigma(Y - Y_i)^2}{(N - 2)}}$$

$$= \sqrt{\frac{62.949,58133}{6}}$$

$$= 10.491,59689$$

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b} = \frac{10.491,59689}{219,97226} = 47,69509$$

$$V_{x0} = \frac{47,69509}{425,85} = 0,11199 \%$$

Lampiran. 5 Perhitungan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Konsentrasi (ppm)	Area (mAU) (Y)	Yi = bx + a	(Y-Yi) ²
0	0	0	0
10,02	7,94268	6,99916	0,89022
25,05	29,67605	25,93429	14,00076
50,1	62,69912	54,70555	63,89716
75,15	81,97674	71,50112	109,73861
100,2	115,55209	100,75355	218,99678
150,3	175,02178	152,56634	504,24678
200,4	227,95134	198,68107	856,74870
y = 1,14778x - 0,09082		r = 0,9992	Σ = 1.768,51901
Slope = 1,14778			
SD = 3,36118			
Batas deteksi = 8,78525ppm		Batas kuantitasi= 29,28418 ppm	

$$LOD = \frac{3 \times SD}{slope}$$

$$= \frac{3 \times 3,36118}{1,14778} = 8,78525 \text{ ppm}$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{slope}$$

$$= \frac{10 \times 3,36118}{1,14778} = 29,28418 \text{ ppm}$$

Lampiran. 6 Perhitungan Kadar Senyawa Kafein

1. Hasil penimbangan sampel ekstrak teh hitam 3 kali berturut-turut adalah 0,0100 gram; 0,0101 gram; 0,0101 gram dilarutkan dalam 10 mL aquadest didapatkan konsentrasi sebesar 1000 ppm, 1010 ppm, 1010 ppm
2. Diperoleh rata-rata $x = 2576,50407$ ppm (mg/L)
3. Persamaan regresi yang diperoleh $y = 0,75852x + 106,19513$
4. Maka $x = \frac{6576,50407 - 106,19513}{0,75852} = 8530,17578$ mg/L
5. Konsentrasi yang diperoleh $6576,50407$ mg/L $\times 0,01$ L = 65,76504 mg
6. $\% \text{ b/b} = \frac{\text{konsentrasi kafein (mg)}}{\text{konsentrasi sampel (mg)}} \times 100\%$

$$= \frac{65,76504 \text{ mg}}{10 \text{ mg}} \times 100\%$$

$$= 6,57650 \% \text{ b/b}$$

CURRICULUM VITAE



Nama : Dyah Purwaning Tyas
Tempat, Tanggal Lahir : Jember, 21 September 1998
Jenis kelamin : Perempuan
Kewarganegaraan : Indonesia
Agama : Islam
Status : Belum kawin
Alamat : Jl. Manyar Gg. Antrokan RT 02/RW 04
No.telp : 08972268490
Email : purwaningtyasdyah25@gmail.com

DATA PENDIDIKAN

2002-2004 : Pernah bersekolah di TK Bhayangkari Kalisat
2004-2010 : Pernah bersekolah di SDN Slawu 03
2010-2013 : Pernah bersekolah di SMPN 07 Jember
2013-2016 : Pernah bersekolah di SMK Farmasi dr. Soebandi Jember
2017-sekarang : Menempuh S1 Farmasi di Stikes dr.Soebandi Jember