

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

Populasi merupakan keseluruhan dari obyek yang diteliti. Populasi dalam penelitian ini adalah minuman cokelat yang dijual di *coffee shop* daerah Delanggu Klaten.

Sampel adalah bagian dari populasi yang dipilih untuk mewakili seluruh populasi dalam suatu penelitian dengan tujuan untuk mendapatkan informasi yang valid dan dapat digeneralisasi ke seluruh populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini meliputi 3 minuman cokelat yang diperoleh dari 3 *coffee shop* daerah Delanggu Klaten.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah analisis kualitatif (identifikasi) dan kuantitatif (penetapan kadar) kafein pada minuman cokelat yang dijual di *coffee shop* daerah Delanggu Klaten dengan metode analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel dalam penelitian ini dibagi menjadi dalam 3 bentuk, yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel terikat.

Variabel bebas merupakan variabel acuan yang dapat diubah untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel terikat, yang mana dalam penelitian ini variabel bebas adalah sampel minuman coklat yang dijual di *coffee shop* daerah Delanggu Klaten.

Variabel terikat merupakan variabel yang menjadi titik pusat permasalahan yang akan diteliti. Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar kafein dalam sampel minuman cokelat yang dijual di *coffee shop* daerah Delanggu Klaten.

Variabel kendali merupakan variabel yang dapat memberi pengaruh terhadap topik yang diteliti (variabel tergantung) dimana pada penelitian ini

variabel kendalinya meliputi kondisi peneliti, cepat lambatnya penginjekan, ketepatan preparasi sampel.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, minuman cokelat adalah produk olahan yang berasal dari bubuk cokelat atau kakao.

Kedua, kafein adalah senyawa alkaloid xantin yang bekerja sebagai obat perangsang psikoaktif dan diuretik ringan.

Ketiga, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah teknik analisis kimia yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi dan mengukur komponen senyawa/campuran.

Keempat, fase gerak yang digunakan adalah campuran metanol : aquabides (40:60)

C. Alat dan bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, seperangkat alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Shimadzu SPD-20A, Spektrofotometri UV-Vis, *syringe filter*, neraca analitik, alat-alat laboratorium yang lazim digunakan, cawan porselin, penangas air, kertas saring, lampu spirtus dan kaki tiga.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel minuman cokelat A, B dan C, baku kafein BPFI, methanol for KCKT, kloroform (CHCl_3), aquabides, kalsium karbonat (CaCO_3), reagen parry

D. Jalannya penelitian

1. Preparasi sampel

Sebanyak 25 mL sampel ditambah 1 gram CaCO_3 kemudian didihkan, diaduk hingga larut. Sampel disaring menggunakan kertas saring dalam keadaan panas, dan hasil saringan ditampung dalam gelas piala. Filtrat dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian diekstraksi dengan 25 mL kloroform dilakukan sebanyak 2 kali dan digojog hingga membentuk 2 lapisan, fase kloroform terdapat pada lapisan

bawah. Fase kloroform dipisahkan dan dikumpulkan. Filtrat ditampung dalam cawan porselin dan diuapkan diatas penangas air sampai fraksi kloroform hilang. Filtrat yang telah kering dilarutkan menggunakan fase gerak methanol : aquabides (40 : 60) kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur ad 10 mL (Prasasty, 2019).

2. Analisis kualitatif

2.1. Reaksi warna Parry. Kristal kafein hasil sublimasi dilarutkan dengan etanol 96% ditambah ammonia encer dan beberapa tetes reagen parry. Hasil positif menunjukkan warna menjadi hijau (Susanti *et al*, 2020).

3. Analisis kuantitatif secara KCKT

3.1 Pembuatan larutan baku kafein. Ditimbang seksama 0,05 mg baku kafein dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 mL ditambahkan aquabides sampai tanda batas, dikocok hingga homogen sehingga didapatkan larutan induk konsentrasi 1000 ppm (Prasasty, 2019).

3.2 Penentuan panjang gelombang maksimal. Diambil larutan baku kafein pada salah satu konsentrasi kemudian disaring menggunakan membran filter ukuran 0,45 μm kemudian diinjeksikan ke dalam instrument KCKT dan dilakukan pada rentang panjang gelombang 200-300 (Prasasty, 2019).

3.3 Penyiapan kondisi analisis KCKT. Digunakan laju alir 1 mL/menit, panjang gelombang 276 nm, kolom C18, fase gerak methanol : air (40:60), detektor UV, volume penginjekkan 10 μl (Kemenkes, 2014).

3.4 Pembuatan kurva baku kalibrasi. Dibuat kurva baku kalibrasi dari larutan baku kafein sebanyak 5 deret konsentrasi secara berturut-turt 49,8 ppm; 99,6 ppm; 149,4 ppm; 199,2 ppm; 249 ppm. Masing-masing konsentrasi disaring menggunakan membran filter ukuran 0,45 μm kemudian diinjeksikan ke dalam instrument KCKT pada panjang gelombang yang diperoleh (Prasasty, 2019).

3.5 Penetapan kadar kafein pada sampel. Filtrat yang telah dilarutkan dengan methanol : aquabides (40:60) dalam labu tentukur 10 mL kemudian disaring menggunakan membran filter ukuran 0,45 μm ke dalam instrument KCKT pada panjang gelombang yang diperoleh. (Safitri & Aprilia, 2022)

4. Verifikasi metode analisis

4.1. Linearitas. Uji linearitas dilakukan dengan mengukur luas area pada konsentrasi 49,8 ppm; 99,6 ppm; 149,4 ppm; 199,2 ppm; 249 ppm pada panjang gelombang yang diperoleh, kemudian hasilnya dianalisis menggunakan persamaan regresi linear $y = a + b x$ (Safitri & Aprilia, 2022).

4.2. Presisi. Mengukur luas area pada konsentrasi 199,2 ppm diinjeksikan 6 kali ke dalam instrumen KCKT, kemudian di tetapkan kadarnya berdasarkan persamaan dari kurva baku yang diperoleh. Selanjutnya dihitung nilai mean, SD (*Standard Deviation*) dan % RSD (*Relative Standard Deviation*) (Safitri & Aprilia, 2022).

4.3. Akurasi. Uji akurasi dilakukan pada 80 %, 100%, dan 120% dari pemipatan baku lalu diinjeksikan ke dalam KCKT. Masing-masing konsentrasi direplikasi sebanyak 3 kali. Nilai akurasi dinyatakan sebagai % recovery (Safitri & Aprilia, 2022).

5. Analisis Data secara KCKT.

Analisis data dilakukan dengan menggunakan hasil pembacaan luas area sampel yang diperoleh (y) yang kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear (a dan b) menggunakan hubungan luas area sampel dan konsentrasi ppm.

Regresi linear

$$y = a + bx$$

keterangan :

y = luas area sampel yang didapat

a = konstanta

b = koefisien regresi (kemiringan)

Berdasarkan persamaan tersebut, konsentrasi kafein dalam sampel dapat dihitung menggunakan rumus :

Kadar (mg/sajian) =

$$\frac{x \left(\frac{mg}{ml} \right) \cdot \text{volume pembuatan (mL)} \cdot \text{faktor pengenceran} \cdot \left(\frac{\text{volume sampel}}{\text{volume pemipetan}} \right)}{\text{volume penginjekkan sampel (mL)}}$$