

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan dari subjek yang akan diteliti. Populasi pada penelitian ini yaitu es teh yang dijual di sekitar pasar Mojosongo Kecamatan Jebres, kota Surakarta. Sampel adalah sebagian dari populasi tersebut, sampel dalam penelitian ini meliputi es teh dalam bentuk cup yang dijual di sekitar pasar Mojosongo Kecamatan Jebres, kota Surakarta yang diambil pada bulan Mei tahun 2025 dan dijual dilokasi strategis dengan kemungkinan banyak dibeli oleh konsumen.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini meliputi analisis kualitatif dan analisis kuantitatif pada sampel es teh yang dijual di sekitar pasar Mojosongo Jebres Kota Surakarta secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel Variabel dalam penelitian ini diklasifikasikan 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 es teh.

Variabel terikat merupakan variabel yang menjadi titik pusat permasalahan yang akan diteliti. Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar kafein pada sampel es teh yang dijual di sekitar pasar Mojosongo Kecamatan Jebres di kota Surakarta.

Variabel kendali merupakan variabel yang dapat memberi pengaruh terhadap topik yang diteliti (variabel tergantung), dimana pada penelitian ini variabel kendalinya meliputi metode analisis, pelarut, kondisi alat, reagen pengujian, volume sampel yang digunakan.

C. Definisi Operasional Variabel Utama

Teh adalah salah satu jenis produk minuman yang dikenal dan digemari oleh masyarakat Indonesia yang mengandung katekin yang merupakan senyawa turunan tanin terkondensasi, dikenal juga sebagai senyawa polifenol karena memiliki banyak gugus fungsi hidroksil. Selain itu teh juga mengandung alkaloid kafein yang bersama sama dengan polifenol teh akan membentuk rasa yang menyegarkan.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah salah satu instrument yang dipakai untuk teknik analisis pemisahan secara kualitatif, kuantitatif, pemisahan/isolasi dan pemurnian. Kafein adalah salah satu jenis alkaloid yang banyak terdapat dalam daun teh yang memiliki efek farmakologis bermanfaat secara klinis dan juga memiliki manfaat untuk kesehatan pada sistem saraf pusat. Analisis kualitatif bertujuan untuk mengidentifikasi zat atau komponen dalam suatu sampel, sedangkan analisis kuantitatif bertujuan untuk menentukan jumlah atau kadar zat tersebut dalam sampel.

D. Bahan dan Alat

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu HPLC Shimadzu SPD-20A, Spektrofotometer Uv-Vis, timbangan analitik, Beaker glass, gelas ukur, pipet tetes, tabung reaksi, labu tentukur, lampu bunsen, corong kaca, corong pisah, cawan porselin, sonikator, mikro filter 0,45 μm , kertas saring, kapas, batang pengaduk, spatula.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel minuman es teh A, B dan C, kafein baku standar, kloroform (CHCl_3), kalsium karbonat (CaCO_3), aquabides, metanol p.a, metanol for HPLC, pereaksi Parry, dan amonia encer.

E. Jalannya Penelitian

1. Preparasi Sampel

1.1. Isolasi Kafein. Tahap ekstraksi kafein yaitu, sebanyak 50 mL larutan sampel ditambahkan 0,5 gram CaCO_3 , dipanaskan sampai

setengah campuran, didinginkan dan saring, dimasukkan dalam corong pisah, diekstraksi dengan kloroform sebanyak 25 mL, setelah itu digojog lalu diamkan kemudian diambil fase kloroformnya (bening). Kemudian ditambah kloroform kembali sebanyak 25 mL, sebanyak 2 kali. Selanjutnya melakukan penguapan kloroform. Dari penguapan kemudian ditambah dengan metanol dan dilarutkan dalam labu takar 10 mL (Rahmah *et al.*, 2023).

2. Analisis Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan dengan reaksi warna Parry yaitu mengambil sampel yang masing-masing sampel dilarutkan dalam metanol kemudian ditambahkan reagen Parry dan NH_3 (amonia). Hasil menunjukkan positif terdapat kafein jika larutan berwarna hijau/biru tua (Widhyani *et al.*, 2021).

3. Analisis Kuantitatif KCKT

3.1. Pembuatan Fase Gerak. Fase gerak yang digunakan adalah methanol : air dengan perbandingan (1:1). Larutan fase gerak kemudian menjalani proses sonikasi selama 60 menit (Lestary *et al.*, 2023).

3.2. Pembuatan Larutan Baku Kafein. Sejumlah 50 mg kafein BPFI diukur dengan teliti dan dimasukkan ke dalam labu Tentukur 50 mL. Kemudian, kafein tersebut dilarutkan dalam pelarut metanol p.a hingga mencapai tanda batas untuk mencapai konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ (LIB I). Diencerkan baku dengan memipet 5 mL dari baku 1000 ppm dimasukkan dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan metanol sampai tanda batas sehingga didapatkan larutan standar dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan tersebut dilakukan sonikasi selama 10 menit dan kemudian disaring menggunakan mikro filter ukuran pori 0,45 μm (Lestary *et al.*, 2023).

3.3. Panjang Gelombang Maksimum. Diukur serapan kafein dari salah satu larutan seri konsentrasi dengan spektrofotometri UV-Vis pada rentang $\lambda 200\text{--}400\text{ nm}$, kemudian ditentukan panjang gelombang maksimum (λ_{max}) (Lestary *et al.*, 2023).

3.4. Pembuatan Kurva Baku. Dari larutan kafein dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$, dibuat sebanyak 5 seri konsentrasi, yang kemudian dimasukkan ke dalam berbagai labu tentukur 10 mL. Setiap larutan tersebut mengalami proses sonikasi selama 10 menit dan setelah itu di saring menggunakan filter *syringe* dengan ukuran pori 0,45 μm .

Kemudian, larutan-larutan tersebut diinjeksikan ke dalam sistem KCKT dengan volume injeksi 20 μL pada panjang gelombang yang didapat dan laju alir 1 mL/menit. Selanjutnya, dilakukan pengamatan terhadap puncak serta luas area di bawah kurva (AUC) (Lestary *et al.*, 2023)

3.5. Penetapan Kadar Kafein. Dari sampel yang telah dipreparasi dan dilakukan penguapan dilanjutkan dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu tentukur 10 mL, disonikasi kemudian di saring menggunakan spuit filter dengan ukuran pori 0,45 μm . Selanjutnya, 20 μl dari larutan tersebut diinjeksikan ke dalam sistem KCKT pada panjang gelombang 273 nm, dengan laju alir 1 mL/menit, dan menggunakan perbandingan fase gerak air:metanol sebesar 1:1 (Lestary *et al.*, 2023).

3. Validasi Metode Analisis

3.1 Linearitas. Linearitas ialah kemampuan suatu metode analisis untuk menunjukkan hasil konsentrasi yang linear terhadap kepekatan analit dalam jangkauan kepekatan tertentu. Hasil penelitian yang didapatkan harus linear terhadap konsentrasi larutan baku dengan nilai koefisien korelasi mendekati 1.00 dengan nilai linearitas yang baik adalah $0,99 \leq r \leq 1$. Larutan standar dengan 5 konsentrasi diinjeksikan sebanyak 20 μl ke dalam sistem KCKT. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot konsentrasi dan luas puncak pada masing-masing konsentrasi. Harga koefisien korelasi (r) ditentukan dengan persamaan regresi linier : $y = a + bx$ (Arel *et al.*, 2017).

3.2 Presisi. Presisi merupakan suatu kedekatan hasil pengukuran analisis contoh yang sama yang dilakukan secara berulang-ulang. Penentuan ketelitian ini sebagai simpangan baku (SD) dan %RSD (*Relative Standar Deviation*). Keseksamaan dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatbility*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Uji presisi ditentukan dengan menganalisis larutan standar pada satu konsentrasi tertentu, dipipet 0,1 mL. Kemudian dimasukkan ke labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya dengan fase gerak. Suntikkan larutan standar tersebut ke dalam KCKT sebanyak 6 kali suntikan berulang. Presisi

diukur berdasar parameter *relative standard deviation* (RSD) ($RSD \leq 2,0\%$) (Arel *et al.*, 2017).

3.3 Akurasi. Tes *recovery* digunakan untuk menguji akurasi metode. Tes *recovery* dilakukan pada 3 konsentrasi berbeda dan masing-masing diulang 3 kali. kemudian di hitung menggunakan rumus % Recovery. Sayarat % perolehan kembali uji akurasi adalah 98,5-101% dalam farmakope indonesia ed V

3.4 Spesifisitas. Pada uji ini dilakukan dengan menginjekkan semua sampel dan baku pada alat KCKT kemudian dibandingkan hasil waktu retensi antara baku dan sampel (Arel *et al.*, 2017).

F. Analisis Hasil

Pada analisis hasil yang didapat berupa kromatogram. Analisis kualitatif kafein dilakukan dengan metode KCKT, yaitu dengan cara membandingkan kromatogram sampel dengan kromatogram baku pembanding berdasarkan waktu retensinya. Hasil analisis kuantitatif dilakukan dengan memasukkan data luas area setiap sampel yang dianalisis ke dalam persamaan garis yang diperoleh dari kurva kalibrasi.