

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Teh merupakan salah satu jenis minuman yang paling sering dikonsumsi setelah air. Teh (*Camellia sinensis* L.) mengandung berbagai senyawa kimia kompleks, seperti flavonoid, alkaloid, tanin, protein, asam amino, enzim, vitamin, serta mineral (Zn, Se, Mo, Ge, dan Mg) yang berperan sebagai zat antimutagenik, antikanker, antibakteri, dan antioksidan (Panjaitan et al., 2022). Salah satu kandungan penting dalam teh adalah kafein, senyawa turunan alkaloid yang berfungsi sebagai stimulan sistem saraf pusat. Konsumsi kafein dalam jumlah wajar diketahui dapat meningkatkan konsentrasi dan menekan rasa kantuk, namun konsumsi secara berlebihan berpotensi menimbulkan efek negatif seperti sakit kepala dan insomnia (Abriyani et al., 2022).

Penentuan kadar kafein pada teh menjadi sangat penting khususnya dalam industri pangan untuk memastikan kualitas dan keamanan suatu produk. Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-7152-2006, menetapkan bahwa batas maksimum kafein dalam produk minuman adalah 50 mg per sajian dan 150 mg per hari (Panjaitan et al., 2022). *Food and Drug Administration* (FDA) juga merekomendasikan batas konsumsi kafein harian sebesar 100-200 mg (Abriyani et al., 2022). Faktor seperti jenis daun teh, lokasi pertumbuhan, ukuran partikel, serta metode dan durasi penyeduhan dapat memengaruhi kadar kafein dalam teh (Panjaitan et al., 2022). Berdasarkan proses pengolahannya, teh digolongkan menjadi empat jenis, yaitu teh hitam, teh hijau, teh oolong, dan teh putih (Wardani dan Fernanda, 2016).

Berbagai metode analisis kadar kafein telah dikembangkan sejak dahulu, seperti titrimetri, spektrofotometri, polarografi, gas kromatografi, dan kromatografi cair kinerja tinggi. Metode seperti titrimetri memerlukan sampel dalam jumlah besar dan rentan terhadap gangguan reagen, sedangkan kromatografi membutuhkan peralatan mahal dan keahlian khusus (Alpdogan et al., 2002). Sebagai alternatif, metode spektrofotometri UV-Vis dipilih karena lebih ekonomis, praktis, dan cocok untuk laboratorium sederhana. Spektrofotometri UV-Vis memiliki keunggulan berupa sensitivitas dan selektivitas tinggi dengan estimasi kesalahan relatif sekitar 1 – 3% serta memungkinkan analisis larutan dengan konsentrasi kecil secara cepat dan akurat (Rohmah et al., 2021). Prinsip Spektrofotometri UV-Vis yaitu penyerapan sinar tampak untuk UV dengan suatu molekul yang dapat menyebabkan terjadinya eksitasi molekul dari tingkat energi rendah ke tingkat energi lebih tinggi (Abriyani et al., 2023).

Penentuan kadar kafein sering dilakukan dengan ekstraksi pelarut, di mana pelarut seperti diklorometana, kloroform, dan etil asetat sering digunakan (Desai, 2020). Menurut Belay (2010) pelarut ini berfungsi melarutkan kafein dari fase air karena sifatnya yang non-polar. Diklorometana dianggap paling efektif karena memiliki efisiensi ekstraksi tinggi (98 - 99%) dan titik didih rendah, memudahkan penguapan untuk memisahkan kafein murni. Pernyataan tersebut diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Sharif et al. (2014) menunjukkan bahwa diklorometana memiliki koefisien serapan molar tertinggi, yang berarti lebih banyak kafein dapat diserap dan dipisahkan, menjadikannya pelarut paling efisien untuk ekstraksi kafein. Adnan dan Rani (2024) menjelaskan bahwa kadar kafein dalam teh dapat dipengaruhi oleh interferensi senyawa lain, seperti

polifenol, tanin, dan pigmen yang menyerap cahaya pada panjang gelombang sama dengan kafein, serta variasi konsentrasi pelarut juga memengaruhi konsistensi hasil (Garg, 2021). Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan uji kinerja analitik menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang dianggap dapat digunakan sebagai alternatif yang lebih sederhana dan ekonomis dalam analisis kadar kafein untuk diterapkan di laboratorium industri maupun akademik (Maghfiroh et al., 2022).

Penentuan parameter kinerja analitik melalui validasi metode untuk analisis kadar kafein pada teh menggunakan ekstraksi dan spektrofotometri UV-Vis bertujuan untuk menentukan parameter seperti linearitas, akurasi, presisi, limit deteksi, limit kuantitasi, dan *robustness* (uji ketahanan metode) sehingga metode ini dapat digunakan sebagai alternatif yang andal untuk analisis kadar kafein pada teh (Perbina et al., 2020). Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi signifikan dalam pengembangan metode analisis yang praktis dan andal untuk menentukan kadar kafein dalam teh. Jika berhasil, metode ini tidak hanya dapat digunakan di laboratorium penelitian tetapi juga di industri yang membantu produsen teh dalam menjaga kualitas produk dan memenuhi standar yang ditetapkan.

1.2 Teori

1.2.1 Teh

Teh (*Camellia sinensis* L.) merupakan salah satu jenis minuman yang telah dikonsumsi sekitar sepuluh abad lamanya. Teh dapat tumbuh di daerah dengan iklim tropis dan subtropis seperti Cina, India, Sri Lanka dan Jepang. Teh merupakan minuman diperoleh dari proses pengolahan daun teh, terutama jenis *Camellia sinensis*, melalui proses fermentasi atau tanpa fermentasi yang dapat mempengaruhi rasa dan karakteristik (Kisiga, 2023). Berdasarkan cara pengolahannya teh diklasifikasikan menjadi 4 jenis yaitu, teh hijau, teh oolong, teh hitam dan teh putih (Hong et al., 2017).

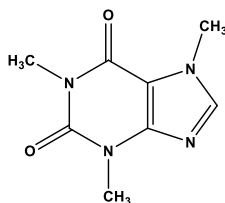
- a. Teh hitam; diproses melalui fermentasi penuh, yang menghasilkan warna hitam pekat serta memiliki cita rasa yang kuat. Teh hitam kaya akan kandungan teaflavin dan tearubigin, yang memberi rasa yang khas serta manfaat sebagai antioksidan yang bermanfaat dalam penurunan tekanan darah dan perlindungan jantung (Cabrera et al., 2006).
- b. Teh oolong: diolah melalui proses fermentasi sebagian, yang menghasilkan aroma serta cita rasa yang khas. Teh oolong juga kaya akan antioksidan, anti inflamasi, yang bermanfaat dalam menurunkan kolesterol (Rustamsyah et al., 2024).
- c. Teh hijau; diolah tanpa melalui proses fermentasi. Teh hijau dibuat melalui proses pemanasan (dikukus atau disangrai) untuk meminimalisir oksidasi daun, oleh karena itu teh hijau memiliki kadar antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan teh hitam dan teh oolong, yang bermanfaat dalam peningkatan fungsi otak, pembakaran lemak, dan penurunan risiko penyakit kardiovaskular (Balentine et al., 2017).
- d. Teh putih; dibuat dari daun teh muda, tanpa melalui proses fermentasi untuk meminimalisir terjadinya oksidasi pada daun, karena dibuat dari daun teh muda maka teh putih memiliki kandungan antioksidan yang paling tinggi dengan manfaat kesehatan seperti menjaga kesehatan jantung, antikanker dan antimikroba (Linnarto et al., 2019).

Menurut Wibowo et al. (2022) teh mengandung berbagai senyawa seperti, flavonoid yaitu katekin dan flavonol (kaemferol, kuersetin, dan mirisetin), asam fenolat (asam galat, asam folat), teaflavin, tearubigin, kafein, teobromin, teofilin, vitamin C dan beberapa mineral yaitu Al, Mg, K, F, Fe, Ca, Na, Mn, dan Zn. Secara taksonomi teh (*Camellia sinensis* L.) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
 Diivisio : Spermatophyta
 Sub division : Angiospermae
 Class : Dicotyledoneae
 Ordo : Guttiferales
 Family : Theaceae
 Genus : Camellia
 Species : *Camellia sinensis* L.

1.2.2 Kafein dalam Teh

Kafein merupakan anggota dari senyawa metilxantin, yang terdiri dari teobromin (3,7-dimetilxantin) dan paraxantin (1,7-dimetilxantin) dan asam metilurat yang dikenal sebagai alkaloid purin yang dapat ditemukan dalam olahan minuman seperti kopi dan teh (Atalay dan Erge, 2017). Kafein berbentuk kristal putih dengan rumus molekul $C_8H_{10}N_4O_2$ dan nama kafein dalam sistem IUPAC yaitu 1,3,7-trimetilpurin-2,6-dion atau 1,3,7-trimetilxantin (Shao dan Zhang, 2019).



Gambar 1. Struktur Kafein (Mudigiri dan Jorige, 2023)

Tabel 1. Sifat Fisika dan Kimia Kafein

Sifat- sifat	Rentang/Nilai Standar	
Bentuk	Kristal	Bubuk
Warna	Putih	Putih
Bau	Tidak berbau	Tidak berbau
Berat Molekul	194,19	194,19
Densitas pada suhu 20° C	1,23	1,23
Titik leleh	237, 70 °C	238 °C
Ph	5,91	6,9

Sumber : Pradhan et al., (2017)

Kafein memiliki beragam manfaat diantaranya yaitu dapat meningkatkan fungsi kognitif, menurunkan risiko batu ginjal dan stroke, mencegah penyakit tertentu seperti kanker termasuk kanker kulit, mulut, tenggorokan, serta kanker endometrium dan prostat, namun jika dikonsumsi secara berlebihan dapat menyebabkan depresi, peningkatan tekanan darah, meningkatkan risiko keguguran, serta mempengaruhi reseptor adenosin di otak, sehingga dapat menyebabkan kecemasan, gelisah dan

sulit tidur (Abiya et al., 2022). Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-7152-2006 menetapkan bahwa ketentuan senyawa bioaktif kafein yang terkandung dalam produk pangan minuman memiliki batas maksimum 50 mg per sajian dan 150 mg per hari (Rupa et al., 2020). FDA (*Food Drug Administration*) juga menyatakan bahwa dosis kafein yang diizinkan untuk dikonsumsi yaitu 100-200 mg per hari (Abriyani et al., 2022). Menurut Hilal dan Engelhardt (2007) kadar kafein dalam teh dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jenis teh, teh hitam memiliki kadar kafein yang tinggi karena proses pembuatannya melalui proses fermentasi yang cenderung meningkatkan kadar kafein, sedangkan teh hijau dipanaskan untuk menonaktifkan enzim sehingga kadar kafeinnya lebih rendah. Metode penyeduhan juga berperan penggunaan air panas dan waktu seduh yang lebih lama akan meningkatkan jumlah kafein yang diekstraksi. Kualitas daun juga menentukan kadar kafein, dimana kuncup muda dan daun bagian atas mengandung lebih banyak kafein dibandingkan daun yang lebih tua.

1.2.3 Ekstraksi Kafein

Ekstraksi adalah proses pemisahan senyawa atau zat dari suatu padatan atau larutan dengan bantuan pelarut yang sesuai. Pemisahan dapat terjadi atas kemampuan kelarutan yang berbeda-beda dalam suatu campuran (Supaya, 2019). Berdasarkan prosesnya ekstraksi terbagi dua yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair. Ekstraksi cair-cair adalah suatu proses pemisahan yang didasarkan pada perbedaan distribusi komponen antara dua fase cairan yang tidak saling bercampur. Prinsip dasarnya adalah memindahkan zat terlarut (*solute*) dari satu fase cair ke fase cair lainnya menggunakan pelarut (*solvent*) yang memiliki kemampuan selektivitas tinggi terhadap komponen yang ingin dipisahkan (Müller et al., 2012). Ekstraksi padat-cair adalah proses pemisahan komponen yang larut dari suatu padatan dengan menggunakan pelarut cair. Proses ini melibatkan prinsip difusi dimana pelarut kontak dengan padatan, melarutkan senyawa yang diinginkan, dan membawa senyawa tersebut ke dalam fase cair (Wakeman, 2000).

Basa yang umum digunakan dalam ekstraksi kafein dari daun teh atau biji kopi, yaitu natrium karbonat (Na_2CO_3) atau kalsium karbonat (CaCO_3) yang berfungsi untuk memisahkan kafein dari senyawa lain, terutama tanin. Tanin, senyawa fenolik yang bersifat asam, sering membentuk kompleks dengan kafein, sehingga menghambat proses ekstraksi. Natrium karbonat bekerja dengan mengubah tanin menjadi garam natrium tanat yang larut dalam air, memutus ikatan tanin dengan kafein, sehingga kafein terlepas dalam bentuk basa bebas dan lebih mudah diekstraksi menggunakan pelarut organik. Kalsium karbonat memiliki fungsi serupa, namun natrium karbonat lebih efektif karena menghasilkan reaksi yang lebih efisien, mudah larut dalam air, dan memungkinkan pengendalian pH yang lebih optimal selama ekstraksi. Efektivitas dan kemudahan penggunaan ini menjadikan natrium karbonat pilihan utama dalam proses pemisahan kafein (Pradeep et al., 2015).

Secara umum, kafein dalam teh dapat diekstraksi melalui metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut diklorometana, kloroform, dan etil asetat. Diklorometana dianggap lebih efektif dalam ekstraksi kafein. Hal ini dibuktikan dalam penelitian yang dilakukan oleh Atomssa dan Gholap (2011), yang menunjukkan bahwa *molar decadic absorption coefficient* (koefisien serapan molar) untuk kafein dalam diklorometana adalah

1224 m²/mol, jauh lebih tinggi dibandingkan air (920 m²/mol), kloroform (658 m²/mol), dan etil asetat (1008 m²/mol), koefisien serapan yang lebih tinggi menunjukkan bahwa diklorometana lebih efisien dalam mengekstraksi dan melarutkan kafein, sehingga menghasilkan sinyal spektral yang lebih kuat. Menurut Anam (2024) dalam hal toksisitas diklorometana dianggap lebih aman jika dibandingkan dengan kloroform dan etil asetat, kafein juga mudah larut dalam diklorometana karena konstanta dielektriknya lebih tinggi yaitu 8,93 dibandingkan pelarut lainnya. Titik didih diklorometana juga relatif rendah yaitu 39,75 °C oleh karena itu, diklorometana sangat mudah menguap dan terpisah dari zatnya dibandingkan titik didih pelarut lain termasuk kloroform yang berkisar antara 60,5 hingga 61,5 °C. Diklorometana juga relatif stabil secara kimia sehingga tidak mengalami reaksi kimia yang signifikan selama proses ekstraksi kafein, hal ini membantu menjaga integritas kafein dalam sampel.

Metode ekstraksi kafein dari teh dimulai dengan perebusan sampel dalam air yang mengandung natrium karbonat, yang mengubah tanin menjadi garam natrium larut air, sehingga tidak ikut terekstraksi. Setelah filtrasi vakum, larutan yang mengandung kafein diekstraksi menggunakan diklorometana (CH₂Cl₂) dalam corong pisah. Diklorometana dipilih karena kafein sangat larut di dalamnya dan lapisan organik memiliki densitas lebih tinggi, sehingga memisahkan kafein dari fase air. Lapisan diklorometana yang mengandung kafein dikeringkan menggunakan natrium sulfat anhidrat untuk menyerap sisa air, lalu pelarut diuapkan dengan evaporator pada suhu rendah (~39,6 °C), menyisakan kafein mentah. Kafein mentah dimurnikan melalui rekristalisasi menggunakan etanol, yang melarutkan kafein saat dipanaskan dan memungkinkan kristalisasi kafein murni saat didinginkan. Proses ini menghasilkan kafein putih murni dengan efisiensi tinggi (Chaugule et al., 2019).

1.2.4 Kinerja Analitik

Kinerja analitik dalam ilmu kimia merupakan aspek penting yang berkaitan dengan kemampuan suatu metode analisis untuk memberikan hasil yang akurat dan dapat diandalkan. Kinerja analitik dapat didefinisikan sebagai kemampuan metode analisis untuk menghasilkan data yang valid dan dapat dipertanggungjawabkan dalam konteks pengukuran kimia. Hal ini mencakup berbagai parameter yang harus dipenuhi untuk memastikan bahwa hasil analisis dapat diterima secara ilmiah dan sesuai dengan standar yang ditetapkan (Panggabean et al., 2019).

Kinerja analitik terbagi menjadi dua kategori utama, yaitu validasi dan verifikasi metode. Validasi metode adalah proses untuk memastikan bahwa metode analisis yang digunakan dapat memberikan hasil yang akurat dan dapat diandalkan untuk tujuan tertentu. Verifikasi metode adalah proses untuk memastikan bahwa metode yang telah divalidasi dapat diterapkan dengan baik dalam kondisi tertentu, termasuk pengujian ulang untuk memastikan konsistensi hasil. Perbedaan utama antara validasi dan verifikasi adalah bahwa validasi dilakukan sebelum metode diterapkan secara luas, sedangkan verifikasi dilakukan setelah metode diterapkan untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh tetap konsisten dan dapat diandalkan (Riyanto, 2014).

Validasi metode pengujian umumnya menggunakan metode tidak baku seperti jurnal, metode dari *manual book* alat, dan lainnya sedangkan, verifikasi metode menggunakan metode pengujian standar seperti *Organization for Standardization* (ISO), Standar

Nasional Indonesia (SNI), *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), dan standar lainnya (Kartika, 2021). Kinerja analitik dapat diukur melalui berbagai kriteria yaitu *linearity* (linearitas), *accuracy* (akurasi), *precision* (presisi), *selectivity* (selektivitas), *sensitivity* (sensitivitas), *limit of detection* (batas deteksi), *limit of quantification* (batas kuantifikasi), *ruggednes* (uji ketangguhan) dan *robustness* (uji ketahanan) (Boqué et al., 2016).

Linearitas dalam kurva kalibrasi mengacu pada kemampuan suatu metode pengukuran untuk menghasilkan hasil yang berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam rentang tertentu. Linearitas menunjukkan seberapa baik hubungan antara nilai yang diukur dan konsentrasi yang sebenarnya dari suatu zat mengikuti hubungan linier (garis lurus). Idealnya, kurva kalibrasi yang linear memiliki koefisien korelasi mendekati 1 ($r \approx 1$) (Winingsih et al., 2018).

Sensitivitas adalah kemampuan suatu metode atau instrumen mendeteksi analit pada konsentrasi sangat rendah, dan dapat diukur melalui *Limit of Detection* (LoD). Selektivitas adalah kemampuan metode untuk membedakan analit yang diukur dari komponen lain yang mungkin ada dalam sampel, maka dapat disimpulkan bahwa sensitivitas fokus pada deteksi konsentrasi rendah, sementara selektivitas lebih pada kemampuan metode untuk mengidentifikasi analit di tengah campuran yang kompleks. LoD merupakan konsentrasi terendah suatu analit yang masih dapat dideteksi oleh suatu metode, tetapi tidak harus dapat diukur dengan akurasi dan presisi yang memadai. Semakin rendah LoD, semakin tinggi sensitivitas instrumen dalam mendeteksi perubahan kecil konsentrasi analit. *Limit of Quantification* (LoQ) adalah konsentrasi terendah di mana analit tidak hanya dapat dideteksi tetapi juga dapat diukur dengan tingkat presisi dan akurasi yang dapat diterima dengan kata lain, LoQ adalah batas di mana konsentrasi analit dapat diukur secara kuantitatif dengan ketelitian yang memadai (Krummenauer et al., 2023).

Akurasi adalah ukuran seberapa dekat hasil analisis dengan nilai sebenarnya dari analit. Pada validasi metode uji, akurasi dinilai melalui persentase perolehan kembali atau *%recovery*. Hal tersebut dilakukan dengan menambahkan analit murni pada sampel plasebo atau melalui metode penambahan baku atau pemakaian *certified reference material* (CRM), sampel dianalisis sebelum dan setelah penambahan analit. Akurasi yang baik ditunjukkan oleh *%recovery* yang mendekati 100%, menunjukkan hasil analisis yang andal (Riyanto, 2014).

Presisi adalah ukuran konsistensi hasil uji yang dilakukan berulang kali menggunakan metode yang sama. Terdapat dua jenis presisi: riptabilitas, yang mengevaluasi hasil uji oleh analis yang sama dalam kondisi serupa, dan reproduibilitas, yang mengukur konsistensi di bawah kondisi yang berbeda, seperti oleh analis atau peralatan yang berbeda. Presisi dinilai melalui simpangan baku relatif (RSD), dan metode dianggap presisi jika RSD di bawah 5%. Presisi yang baik memastikan hasil uji yang konsisten dan andal (Kartika, 2021).

Robustness didefinisikan sebagai ketahanan metode analitis terhadap perubahan kecil dalam kondisi operasional, seperti pH, suhu, atau konsentrasi pelarut, untuk memastikan hasil yang konsisten meskipun ada variasi minor. *Ruggedness* lebih fokus pada uji reproduktibilitas di berbagai laboratorium, yang mengukur seberapa stabil metode ketika diterapkan oleh analis yang berbeda atau menggunakan instrumen yang berbeda (Karageorgou & Samanidou, 2014).

1.2.5 Spektrofotometri UV- Vis

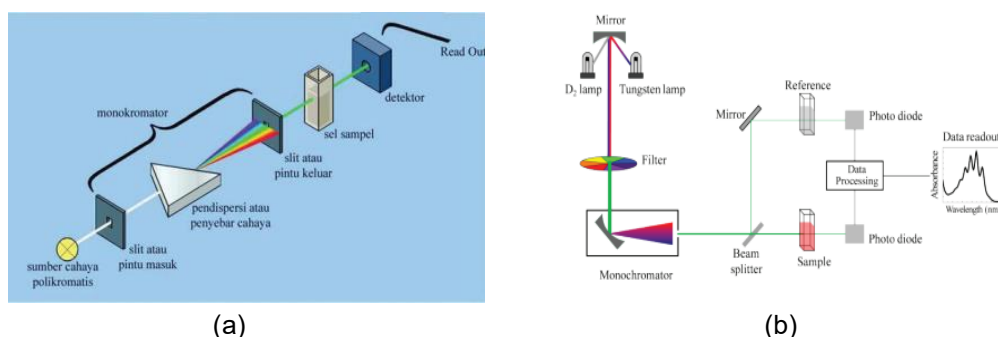
Spektrofotometer UV-Vis adalah alat yang digunakan untuk menganalisis bagaimana senyawa organik berinteraksi dengan sinar ultraviolet (UV) dengan rentang 200-400 nm dan sinar tampak (Vis) dengan rentang 400-800 nm. Spektrofotometri ini bekerja berdasarkan prinsip bahwa senyawa kimia dapat menyerap sinar UV dan tampak pada panjang gelombang tertentu, yang kemudian direkam dalam bentuk spektrum. Spektrum ini menunjukkan panjang gelombang (λ) dan tingkat absorbansi dari senyawa tersebut (Suhartati, 2015).

Menurut Sethuraman et al., (2013), prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada hukum Lambert-Beer, yang menyatakan bahwa absorbansi (A) suatu zat berbanding lurus dengan konsentrasi (c) zat tersebut dan panjang lintasan (b) cahaya yang melewati sampel. Hukum ini berlaku ketika konsentrasi sampel rendah, di mana hubungan antara absorbansi dan konsentrasi tetap linier. Persamaan dasarnya adalah:

$$A = \epsilon \times b \times c \quad (1)$$

dimana: A adalah absorbansi, ϵ adalah koefisien ekstinsi molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b adalah panjang lintasan (cm), dan c adalah konsentrasi larutan.

Spektrofotometer UV-Vis *single-beam* adalah instrumen yang menggunakan satu jalur cahaya yang melewati sampel, di mana intensitas cahaya diukur sebelum dan sesudah melewati sampel secara terpisah. Jenis ini lebih sederhana dan ekonomis, tetapi rentan pada perubahan intensitas cahaya dari sumber, yang dapat memengaruhi akurasi hasil. Spektrofotometer *double-beam* menggunakan dua jalur cahaya yang terbagi: satu melewati sampel dan satu lagi melalui blanko (referensi). Kedua sinar diukur secara bersamaan atau bergantian, sehingga fluktuasi cahaya dari sumber dapat dikompensasi, menjadikannya lebih stabil dan akurat. *Double-beam* lebih kompleks dan mahal, tetapi ideal untuk analisis yang membutuhkan presisi tinggi (Suhartati, 2015).



Gambar 2. (a) Spektrofotometer *Single-beam* dan (b) Spektrofotometer *Double-beam* (Suhartati, 2015)

Spektrofotometer UV-Vis terdiri dari beberapa bagian penting yang bekerja bersama untuk mengukur penyerapan cahaya oleh sampel. Sumber cahaya, seperti lampu deuterium untuk ultraviolet dan lampu tungsten untuk sinar tampak, menghasilkan cahaya polikromatis yang dibutuhkan. Cahaya ini kemudian dipisahkan oleh monokromator, yang menggunakan prisma atau kisi difraksi untuk memilih panjang gelombang tertentu sesuai kebutuhan analisis. Kuvet digunakan sebagai wadah untuk

sampel, biasanya terbuat dari kuarsa untuk sinar UV atau gelas untuk sinar tampak. Setelah cahaya melewati sampel, detektor seperti fotodiode atau tabung fotomultiplier menangkap cahaya yang diteruskan dan mengubahnya menjadi sinyal listrik. Sinyal ini diperkuat oleh penguat sinyal sebelum dianalisis oleh unit pemroses data, yang kemudian menampilkan hasilnya pada layar. Setiap komponen ini berperan penting untuk memastikan hasil pengukuran yang akurat dan andal (Suhartati, 2015).

Spektrofotometer UV-Vis dapat dipilih dalam analisis kadar kafein dibandingkan HPLC karena lebih cepat, sederhana, dan hemat biaya. Metode UV-Vis hanya membutuhkan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang tertentu, tanpa perlu proses pemisahan yang kompleks seperti pada HPLC. Hal ini membuat UV-Vis lebih efisien dan praktis untuk analisis rutin atau dalam laboratorium sederhana, terutama pada sampel yang tidak kompleks, seperti kopi ataupun teh. Selain itu, UV-Vis lebih mudah dioperasikan dan tidak memerlukan bahan kimia tambahan, sehingga lebih ekonomis (Dulanebit et al., 2020). Hal ini dibuktikan dalam penelitian oleh Eticha dan Bedassa (2020), analisis kadar kafein menggunakan spektrofotometri UV-Vis terbukti memberikan hasil yang baik dengan tingkat linearitas $R^2 = 0,9997$, LoD 0,284 mg/L, LoQ= 0,86 dan akurasi %Recovery (99%).

1.3 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. berapa nilai parameter kinerja analitik yang meliputi linearitas, akurasi, presisi, limit deteksi, limit kuantitasi dan ketahanan metode penentuan kadar kafein dalam teh menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis?
2. bagaimana validitas hasil pengukuran dari metode penentuan kadar kafein dalam teh menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis?
3. apakah kadar kafein dalam teh yang diuji memenuhi standar keamanan pangan sesuai dengan SNI 01-7152-2006?

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. menentukan nilai parameter kinerja analitik yang meliputi linearitas, akurasi, presisi, limit deteksi, limit kuantitasi, dan ketahanan metode penentuan kadar kafein dalam teh menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis.
2. memperoleh validitas hasil pengukuran dari metode penentuan kadar kafein dalam teh menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis.
3. menilai kesesuaian kadar kafein dalam teh yang diuji dengan standar keamanan pangan yang ditetapkan dalam SNI 01-7152-2006.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai penerapan dan cara melakukan pengujian terhadap suatu metode sebelum digunakan di laboratorium, serta dapat memberikan pemahaman yang lebih baik tentang faktor-faktor yang mempengaruhi kadar kafein dalam teh, sehingga bermanfaat bagi konsumen dalam membuat pilihan yang lebih informasional.

BAB II

METODE

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu teh hijau; standar $C_8H_{10}N_4O_2$ (Sigma-Aldrich); CH_2Cl_2 (Merck); Na_2CO_3 (Merck); Na_2SO_4 anhidrat (Merck), C_2H_5OH 96% (Merck), akuabides, dan kertas saring whattman No.42.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spektrofotometer UV-Vis *shimadzu 1800*, smart evaporator *BioChromato*, buret, statif, labu ukur 50 mL, labu ukur 100 mL, gelas kimia 250 mL dan 50 mL, gelas ukur 25 mL, erlenmeyer 250 mL, pipet skala 1 ml, pipet volume 10 ml, pipet volume 5 mL, spatula, gegep, bulb, corong vial, labu semprot, hotplate, dan neraca analitik.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Juli 2024 sampai November 2024. Adapun tempat pelaksanaan penelitian ini yaitu Laboratorium Kimia Analitik, Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Sampel

Sampel teh hijau diambil sebanyak 3 kantong (6 g) dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL lalu ditambahkan 3 g Na_2CO_3 dan ditambahkan 150 mL akuabides, kemudian dipanaskan selama 15 menit di atas *hotplate*. Larutan tersebut kemudian disaring menggunakan corong dan kertas saring ke dalam erlenmeyer. Larutan hasil penyaringan didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu dilakukan ekstraksi dengan menggunakan diklorometana sebanyak 3 kali dengan masing-masing penambahan 15 mL diklorometana dengan waktu ekstraksi masing-masing 10 menit. Proses ekstraksi akan menghasilkan dua fasa yaitu fasa air dan fasa organik. Fasa organik ditampung dalam erlenmeyer, apabila masih terdapat bulir – bulir air dalam fasa organik, maka fasa organik yang telah ditampung ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat, lalu didekantasi kemudian dimasukkan dalam botol vial. Fasa organik hasil ekstraksi tersebut diuapkan menggunakan smart evaporator. Ekstrak hasil evaporator ditambahkan sedikit etanol 96% dan diuapkan kembali. Setelah itu ekstrak yang telah dihasilkan dilarutkan dengan akuabides ke dalam labu ukur 100 mL (Chaugule et al., 2019).

2.4.2 Pembuatan Larutan Standar Kafein

Larutan induk kafein 1000 mg/L. Sebanyak 0,1 g baku kafein ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala lalu dilarutkan dengan akuabides. Selanjutnya, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu ditambahkan dengan akuabides hingga tanda batas lalu dihomogenkan.

Larutan kafein 100 mg/L. Sebanyak 10 ml larutan induk kafein 1000 mg/L dipipet ke dalam labu ukur 100 ml lalu diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas.

Penentuan panjang gelombang maksimum. Sebanyak 4 mL larutan kafein 100 mg/L dipipet ke dalam labu ukur 50 mL lalu diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas. serapan gelombang maksimumnya diukur pada rentang panjang gelombang 220-350 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan akuabides sebagai blanko.

2.4.3 Kinerja Analitik

Uji Linearitas. Larutan kafein 100 mg/L. Sebanyak 1 mL; 2 mL; 3 mL; 4 mL; 5 mL; 6 mL dan 7 mL dipipet ke dalam labu ukur 50 mL, selanjutnya diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas kemudian dihomogenkan. Absorbansi deret standar diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Linieritas metode dihitung menggunakan persamaan berikut (Suhartati, 2015).

$$y = bx + a \quad (2)$$

dimana, y adalah absorbansi, x adalah konsentrasi, b adalah *slope* (kemiringan garis) dan a adalah *intercept* (titik potong).

Uji Akurasi. Larutan ekstrak kafein dipipet sebanyak 1mL ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan dengan akuabides hingga tanda batas. Sebanyak 1 mL larutan standar kafein 100 mg/L dipipet ke dalam labu ukur 50 ml lalu diencerkan dengan larutan sampel yang telah ditambahkan dengan akuabides hingga tanda batas. Absorbansi larutan kemudian diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Pengulangan uji akurasi dilakukan sebanyak 7 kali. Akurasi metode pada penelitian ini dinyatakan dalam % *recovery* yang dapat dihitung menggunakan persamaan berikut (Mudigiri dan Jorige, 2023).

$$\% \text{Recovery} = \frac{(C_{sp+s}) - (C_s)}{C_{sp}} \times 100 \quad (3)$$

Dimana, C_{sp+s} adalah konsentrasi setelah penambahan *spike*, C_s adalah konsentrasi sampel, dan C_{sp} adalah konsentrasi *spike*.

Uji Presisi. Larutan ekstrak kafein dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan dengan akuabides hingga tanda batas. Absorbansi larutan kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Pengulangan uji presisi dilakukan sebanyak 7 kali. Kadar kafein dalam sampel dapat diukur menggunakan rumus berikut (Rupa et al., 2020):

$$y = bx + a \quad (4)$$

dimana, b adalah *slope* (kemiringan garis) dan a adalah *intercept* (titik potong).

Presisi dapat ditentukan dengan menghitung % *coefisient variation* (%CV) menggunakan persamaan (Indrayanto, 2022).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (5)$$

$$\%CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

dimana: SD adalah standar deviasi, \bar{x} adalah nilai konsentrasi hasil yang diperoleh, dan n adalah jumlah pengulangan

Apabila %CV yang diperoleh > 2%, maka presisi dapat dihitung dengan menggunakan perhitungan CV Horwitz (*Coefficient Variance Horwitz*) dengan persamaan berikut (Indrayanto, 2022):

$$\%CV \text{ Horwitz} = 2^{1-0,5 \log C} \quad (7)$$

dimana: C adalah rata-rata konsentrasi larutan standar dikali 10^{-6} .

Uji Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi. Larutan kafein 100 mg/L. dipipet masing-masing sebanyak 2 mL lalu dimasukkan ke dalam 7 labu ukur 50 mL, selanjutnya diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas kemudian dihomogenkan. Absorbansi deret standar diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Nilai LOD dan LOQ ditentukan menggunakan persamaan (Indrayanto, 2022):

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (8)$$

$$LOD = \frac{3 \times S_{y/x}}{s} \quad (9)$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{s} \quad (10)$$

dimana: $S_{y/x}$ adalah simpangan baku residual, s adalah *slope* (kemiringan garis linearitas), x adalah konsentrasi hasil pengukuran, \bar{x} adalah rata-rata konsentrasi hasil pengukuran, dan n jumlah pengulangan pengukuran.

Uji Robustness. Sampel teh hijau diambil sebanyak 3 kantong (6 g) dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL lalu ditambahkan 3 g Na_2CO_3 dan ditambahkan 150 mL akuabides, kemudian dipanaskan selama 15 menit di atas *hotplate*. Larutan kemudian disaring menggunakan corong dan kertas saring ke dalam erlenmeyer. Larutan hasil penyaringan didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu dilakukan ekstraksi menggunakan diklorometana sebanyak 3 kali dengan masing-masing penambahan 15 mL diklorometana dengan waktu ekstraksi masing-masing 10 menit. Proses ekstraksi akan menghasilkan dua fasa yaitu fasa air dan fasa organik. Fasa organik ditampung dalam erlenmeyer, apabila masih terdapat bulir – bulir air dalam fasa organik, maka fasa organik yang telah ditampung ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat, lalu didekantasi kemudian dimasukkan dalam botol vial, kemudian diuapkan dengan diletakan pada gelas kimia yang berisi air sambil dipanaskan hingga diklorometana menguap seluruhnya dan didapatkan ekstrak kafein kemudian ditambahkan sedikit etanol dan diuapkan kembali. Setelah itu ditimbang ekstrak yang dihasilkan dan dicatat bobotnya, kemudian dilarutkan dengan akuabides ke dalam labu ukur 100 mL.