

BAB V

PEMBAHASAN

5.1 Pembahasan

5.1.1 Validasi Metode

1. Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk memastikan bahwa sistem *HPLC* yang digunakan memiliki kinerja yang memadai sebelum digunakan untuk analisis sampel. Parameter yang diamati meliputi waktu retensi, luas area, dan tinggi puncak. Berdasarkan hasil penelitian, enam kali injeksi larutan standar kafein 40 ppm menghasilkan waktu retensi yang relatif konsisten yaitu pada kisaran 12,228–12,273 menit. Luas area dan tinggi puncak yang diperoleh juga menunjukkan variasi yang kecil antar injeksi.

Konsistensi waktu retensi menunjukkan bahwa laju alir fase gerak, kondisi kolom, dan respons detektor berada dalam kondisi stabil selama analisis berlangsung. Menurut Snyder et al. (2010), waktu retensi yang stabil merupakan indikator bahwa proses pemisahan berlangsung secara reproduksibel sehingga hasil analisis dapat dipercaya. Selain itu, puncak yang terbentuk tampak tajam dan simetris yang mengindikasikan bahwa tidak terjadi gangguan pemisahan maupun interaksi berlebih antara analit dan fase diam.

Hasil ini menunjukkan bahwa sistem *HPLC* yang digunakan telah memenuhi persyaratan kesesuaian sistem dan layak digunakan untuk analisis kadar kafein pada sampel teh.

2. Linearitas

Linearitas menunjukkan kemampuan metode dalam menghasilkan respon yang sebanding dengan konsentrasi analit. Pada penelitian ini digunakan larutan standar kafein dengan konsentrasi 10, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Hasil menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi diikuti oleh peningkatan luas area puncak. Pada konsentrasi 10 ppm diperoleh area sebesar 273.591, sedangkan pada konsentrasi 100 ppm area meningkat menjadi 2.779.877.

Peningkatan area yang berbanding lurus dengan konsentrasi menunjukkan bahwa detektor UV mampu merespons perubahan jumlah

analit secara proporsional. Kondisi ini sesuai dengan prinsip hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi zat pada rentang tertentu. Semakin tinggi konsentrasi kafein maka semakin banyak cahaya yang diserap sehingga menghasilkan sinyal yang lebih besar.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian analisis kafein menggunakan *HPLC* menunjukkan hubungan linear yang sangat kuat pada rentang konsentrasi 10–100 ppm. Dengan demikian metode yang digunakan memiliki kemampuan yang baik untuk digunakan dalam penetapan kadar kafein secara kuantitatif.

3. Akurasi

Akurasi merupakan parameter yang menunjukkan kedekatan hasil pengukuran terhadap nilai sebenarnya. Pengujian dilakukan menggunakan metode penambahan baku (*spike recovery*) pada level 80%, 100%, dan 120%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai *recovery* berada pada rentang 97,22–102,90%. Nilai tersebut memenuhi kriteria ICH Q2(R1) yang mensyaratkan *recovery* pada rentang 95–105%. Hasil *recovery* yang mendekati 100% menunjukkan bahwa metode mampu mengukur kadar kafein secara tepat tanpa adanya kehilangan analit selama proses preparasi maupun analisis.

Keberhasilan *recovery* juga menunjukkan bahwa komponen lain yang terdapat dalam sampel teh tidak memberikan gangguan yang signifikan terhadap deteksi kafein. Dengan kata lain, metode memiliki selektivitas yang baik dalam memisahkan kafein dari senyawa lain seperti tanin, katekin, dan polifenol yang secara alami terdapat dalam teh.

4. Presisi

Presisi menunjukkan tingkat kedekatan hasil pengukuran yang diperoleh dari serangkaian pengulangan dalam kondisi yang sama. Pada penelitian ini presisi diuji pada level konsentrasi 100% dengan enam kali replikasi dan menghasilkan nilai %RSD sebesar 0,3876%.

Nilai tersebut berada jauh di bawah batas maksimum 2% sehingga menunjukkan bahwa metode memiliki keterulangan yang sangat baik. Nilai %RSD yang rendah mengindikasikan bahwa variasi antar pengukuran

sangat kecil sehingga hasil analisis dapat dianggap konsisten dan dapat dipercaya.

Pengujian presisi dilakukan pada konsentrasi 100% karena konsentrasi tersebut mewakili kondisi analisis sebenarnya. Menurut pedoman ICH Q2(R1), repeatability umumnya dilakukan pada satu konsentrasi target dengan minimal enam kali pengulangan. Oleh karena itu penggunaan konsentrasi 100% dan enam replikasi dalam penelitian ini telah sesuai dengan pedoman validasi metode analisis yang berlaku.

5.1.2 Penetapan Kadar sampel

Validasi metode merupakan tahap penting dalam analisis kuantitatif karena bertujuan untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan mampu memberikan hasil yang akurat, presisi, spesifik, dan dapat dipercaya. Menurut International Conference on Harmonisation (ICH), validasi metode analisis dilakukan untuk memastikan bahwa prosedur analisis yang digunakan sesuai dengan tujuan penggunaannya. Pada penelitian ini validasi metode analisis kafein dilakukan menggunakan parameter uji kesesuaian sistem, linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi (LOD), dan batas kuantitasi (LOQ). Seluruh parameter tersebut digunakan untuk mengevaluasi kinerja metode *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* dalam penetapan kadar kafein pada berbagai sampel teh.

Uji kesesuaian sistem dilakukan sebagai tahap awal untuk memastikan bahwa sistem kromatografi bekerja secara optimal sebelum digunakan untuk analisis sampel. Hasil pengujian menunjukkan bahwa waktu retensi kafein berada pada kisaran 12,22–12,27 menit dengan luas area yang relatif seragam pada setiap penyuntikan. Keseragaman waktu retensi menunjukkan bahwa fase gerak, laju alir, kolom, dan detektor bekerja secara stabil selama proses analisis. Selain itu, nilai area yang relatif konstan menunjukkan bahwa instrumen mampu memberikan respons yang baik terhadap senyawa kafein. Kestabilan waktu retensi dan luas area merupakan indikator penting dalam menilai performa sistem kromatografi karena mencerminkan reproduksibilitas metode analisis.

Pengujian linearitas dilakukan menggunakan larutan standar kafein pada konsentrasi 10, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Hasil menunjukkan

bahwa peningkatan konsentrasi larutan standar diikuti oleh peningkatan luas area kromatogram secara proporsional. Pada konsentrasi 10 ppm diperoleh area sebesar 273.591, sedangkan pada konsentrasi 100 ppm area meningkat menjadi 2.779.877. Hubungan yang sebanding antara konsentrasi dan area menunjukkan bahwa respons detektor terhadap kafein bersifat linear pada rentang konsentrasi yang digunakan. Linearitas yang baik menunjukkan bahwa metode mampu memberikan hasil pengukuran yang proporsional terhadap jumlah analit dalam sampel. Suatu metode dikatakan memenuhi persyaratan linearitas apabila terdapat hubungan linier antara konsentrasi analit dengan respons instrumen yang ditunjukkan oleh nilai koefisien korelasi yang mendekati 1.

Parameter akurasi dilakukan untuk mengetahui tingkat kedekatan antara hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya. Pengujian akurasi pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode penambahan baku (standard addition) pada tingkat konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Penggunaan tiga tingkat konsentrasi bertujuan untuk mengevaluasi kemampuan metode dalam mengukur analit pada rentang konsentrasi yang berbeda. Hasil kromatogram menunjukkan bahwa puncak kafein selalu muncul pada waktu retensi yang relatif sama sehingga mengindikasikan bahwa metode memiliki kemampuan identifikasi yang baik terhadap analit yang diuji. Nilai perolehan kembali yang memenuhi persyaratan menunjukkan bahwa metode memiliki tingkat akurasi yang baik dan mampu mengukur kadar kafein secara benar tanpa dipengaruhi oleh komponen lain dalam matriks sampel.

Presisi merupakan ukuran kedekatan hasil pengukuran yang diperoleh dari pengulangan analisis pada kondisi yang sama. Pada penelitian ini pengujian presisi dilakukan pada konsentrasi 100% dengan enam kali replikasi. Pengujian presisi umumnya dilakukan pada satu tingkat konsentrasi yang mewakili konsentrasi kerja metode karena tujuan utamanya adalah mengevaluasi keterulangan (repeatability) metode. Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai %RSD sebesar 0,3876%. Nilai tersebut memenuhi persyaratan karena berada di bawah batas maksimum 2%. Hasil ini menunjukkan bahwa metode memiliki tingkat ketelitian yang

sangat baik dan mampu menghasilkan data yang konsisten pada pengukuran berulang.

Pengujian presisi hanya dilakukan pada konsentrasi 100% karena konsentrasi tersebut merupakan titik tengah rentang kerja metode dan dianggap paling representatif untuk menggambarkan performa metode secara keseluruhan. Selain itu, pedoman ICH menyatakan bahwa pengujian repeatability dapat dilakukan menggunakan minimal enam kali replikasi pada satu konsentrasi yang mewakili kondisi analisis normal. Oleh karena itu, penggunaan enam kali replikasi pada konsentrasi 100% dalam penelitian ini telah memenuhi ketentuan validasi metode dan cukup untuk membuktikan keterulangan hasil analisis.

Parameter batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) digunakan untuk mengetahui sensitivitas metode. LOD menunjukkan konsentrasi terkecil analit yang masih dapat dideteksi oleh instrumen, sedangkan LOQ menunjukkan konsentrasi terkecil yang masih dapat ditentukan secara kuantitatif dengan tingkat ketelitian dan ketepatan yang dapat diterima. Semakin kecil nilai LOD dan LOQ yang diperoleh, maka semakin sensitif metode yang digunakan. Sensitivitas yang baik sangat penting dalam analisis kafein karena memungkinkan pengukuran kadar kafein dalam sampel dengan konsentrasi rendah secara akurat.

Secara keseluruhan, hasil validasi menunjukkan bahwa metode *HPLC* yang digunakan telah memenuhi persyaratan validasi berdasarkan parameter uji kesesuaian sistem, linearitas, akurasi, presisi, LOD, dan LOQ. Oleh karena itu metode ini dapat dinyatakan valid dan layak digunakan untuk penetapan kadar kafein pada berbagai sampel teh yang dianalisis dalam penelitian ini.

Hasil penetapan kadar menunjukkan bahwa masing-masing sampel teh memiliki kadar kafein yang berbeda. Variasi dalam kadar menunjukkan bahwa jenis teh dan proses pengolahannya dapat memengaruhi jumlah kafein yang ada dalam produk. Untuk mengetahui berapa banyak kafein yang aman untuk dikonsumsi setiap hari, informasi tentang kadar kafein ini sangat penting. Hasil penelitian ini dapat menjadi referensi bagi pelanggan dalam memilih dan mengatur konsumsi teh mereka agar tidak melebihi batas asupan kafein yang direkomendasikan:

rekomendasi EFSA dan FDA mengatakan bahwa orang dewasa yang sehat disarankan untuk tidak mengonsumsi lebih dari 400 mg kafein per hari, dan ibu hamil disarankan untuk membatasi hingga 200 mg kafein per hari.

Perbedaan dalam tingkat kafein antara sampel teh berbeda menunjukkan bahwa berbagai faktor memengaruhi kandungan kafein. Faktor-faktor ini termasuk jenis bahan baku, tingkat kematangan daun, proses pengolahan, kondisi penyeduhan, dan proses pembuatan produk. Selain itu, perbedaan dalam proses fermentasi, penyangraian, atau penambahan bahan lain pada produk teh juga dapat memengaruhi jumlah kafein dalam setiap sampel teh. Oleh karena itu, jumlah kafein yang dihasilkan tidak selalu sama meskipun seluruh sampel diklasifikasikan sebagai minuman teh.

Metode *HPLC* yang telah tervalidasi pada penelitian ini mampu memberikan hasil penetapan kadar kafein yang akurat, tepat, dan konsisten. Oleh karena itu, data kadar kafein yang diperoleh dapat dipercaya. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai data pendukung dalam pengawasan mutu produk minuman teh agar tetap memenuhi aspek keamanan konsumsi. Selain itu, informasi tentang kadar kafein pada berbagai sampel teh diharapkan dapat menjadi referensi bagi konsumen dalam memilih produk yang sesuai dengan kebutuhan mereka serta bahan pertimbangan bagi produsen untuk menjaga mutu dan keseragaman kandungan kafein pada produk mereka.

Agar asupan kafein tidak melebihi batas yang direkomendasikan, konsumsi teh sebaiknya tetap memperhatikan jumlah teh yang dikonsumsi setiap hari berdasarkan kadar kafein yang ditemukan pada masing-masing sampel. Meskipun teh adalah minuman yang aman untuk dikonsumsi, frekuensi dan jumlah kafein harus diperhatikan. Ini terutama berlaku untuk orang yang sensitif terhadap kafein seperti ibu hamil, ibu menyusui, dan orang yang mengalami gangguan tidur atau penyakit kardiovaskular. Orang dewasa yang sehat disarankan untuk membatasi konsumsi kafein hingga 400 mg per hari, sedangkan ibu hamil tidak boleh lebih dari 200 mg per hari.