

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Teh

Teh mempunyai nama ilmiah (*Camellia sinensis*) dan merupakan salah satu jenis tanaman perkebunan yang dapat tumbuh di daerah tropis maupun subtropis dengan ketinggian 1.500-2000 m diatas permukaan air laut (m dpl). Suhu ideal bagi tanaman teh berkisar antara 18 - 30° C. Tanaman teh tidak tahan terhadap kekeringan, dan curah hujan yang diperlukan pada perkebunan teh berkisar antara 1.500-2.000 mm pertahun (Sakiroh et al., 2021).

(Dokumentasi Pribadi)



Gambar 1. Tanaman teh

2.1.1. Klasifikasi tanaman teh

Berdasarkan klasifikasi botaninya, teh termasuk dalam kingdom plantae divisi Tracheophyta kelas Mgnoliopsida ordo Ericales famili Theaceae dan genus *Camellia* L. Nama ilmiah botaninya adalah *Camellia sinensis* (L) Kuntze

Secara taksonomi teh dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivision	: Embryophyta

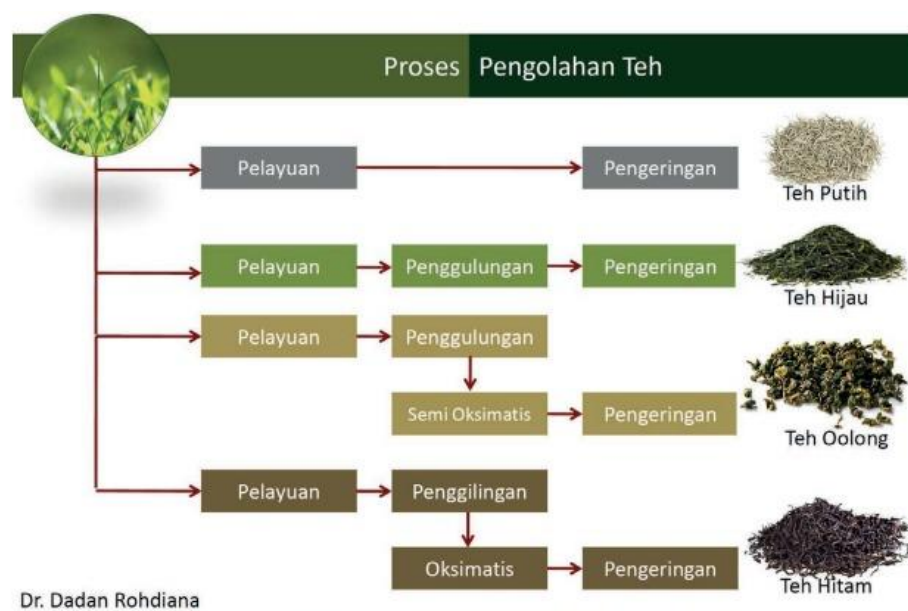
Division	: Tracheophyta
Subdivision	: Spermatophytina
Class	: Magnoliopsida
Superorder	: Asteranae
Order	: Ericales
Family	: Theaceae
Genus	: Camellia L
Species	: Camellia sinensis (L) Kuntze

Integrated Taxonomic Information System (ITIS)

2.1.2. Jenis-jenis teh

Jenis-jenis teh dibuat dari pucuk daun tanaman *Camellia sinensis*. Berdasarkan pengolahannya teh dikategorikan menjadi teh putih, teh hijau (*unfermentated*), teh oolong (*semi fermentated*), dan teh hitam (*fully fermentated*). Jenis-jenis teh dapat dilihat pada Gambar

(Dadan Rohdian 2015)



Gambar 2. Proses pengolahan teh

1. Teh Putih

Teh putih atau *white tea* adalah jenis teh yang diproduksi dengan minim intervensi manusia dan sangat alami. Daun teh segar dipetik, kemudian dibiarkan layu secara alami di udara terbuka atau dalam lingkungan yang dikontrol suhu dan kelembapannya. Selain itu, daun teh dikeringkan untuk mengurangi kadar air. Proses pelayuan ini mengalami sedikit oksidasi, yang membuat teh menjadi lebih gelap. Saat memetik daun teh, penting untuk memastikan kondisi cuaca tidak hujan dan tidak ada embun pada daun, karena daun yang terlalu basah tidak akan menghasilkan teh putih yang berkualitas (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Walaupun terdengar sederhana, produksi teh putih merupakan proses yang sangat sulit dikarenakan proses pelayuannya memerlukan pengaturan kelembapan dan suhu lingkungan yang alami. Oleh karena itu, teh putih umumnya memiliki keterbatasan produksi yang signifikan jika dibandingkan dengan jenis teh lainnya (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Teh putih yang populer seperti *silver needles*, diperoleh dari tanaman *camellia sinensis* dan memiliki variasi yang disebut *da bai hao* atau *big white*. Ciri khasnya yaitu daun pucuk muda ditandai oleh bulu halus berwarna putih, berbentuk lancip, dan aroma khas. Meskipun banyak *silver needles* diproduksi di luar wilayah Fujian, perbedaannya sangat besar yang disebabkan karena adaptasi tanaman teh terhadap tanah dan iklim tempat tumbuhnya (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Proses produksi *silver needles* sangat terbatas. Karena itu, *silver needles* dianggap sebagai teh putih yang paling mahal. Daun yang digunakan hanya pucuk daun yang masih muda dan belum merekah (Ratna Somantri & Tanti, 2013).

2. Teh Hijau

Teh hijau memiliki popularitas tinggi di Jepang dan China, teh hijau juga memiliki julukan "teh yang tidak mengalami oksidasi atau tidak difermentasi". Pada saat produksi, daun teh diberi perlakuan panas yang bertujuan untuk menghentikan proses oksidasi. Metode ini dapat melibatkan beberapa cara, seperti pengeringan dengan sinar matahari (*sun-dried*), *basket-fired*, *pan-fired*, pengeringan dengan

putaran (*tumble dried*), pengeringan dalam oven (*oven dried*), dan pengukusan atau *steamed* (Ratna Somantri & Tanti 2013)

Sun-dried merupakan cara tradisional yaitu dengan cara menjemur daun teh yang masih segar di bawah cahaya matahari. Proses ini membutuhkan waktu yang lama, dimana daun teh yang sedang dikeringkan perlu dibalik secara rutin agar keringnya merata. Pengeringan sangat bergantung pada kondisi cuaca. Setelah dijemur dan dirasa kelembapan daun telah berkurang kira-kira 60%, daun teh selanjutnya dikeringkan kembali di atas api (*fired*) hingga benar-benar kering. Proses ini hanya cocok untuk dilakukan di daerah yang kering. Di Indonesia dan sekitarnya yaitu Asia Tenggara, metode ini kurang sesuai dikarenakan cuaca dan iklimnya yang lembab (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Basket-fired merupakan teknik untuk mengeringkan teh yang umum digunakan di beberapa wilayah China. Prosedurnya melibatkan peletakan daun teh segar yang baru dipetik di atas wadah pipih yang terbuat dari bambu, kemudian disimpan di atas arang yang panas selama beberapa waktu. Setelah itu wadah diangkat, lalu disimpan kembali, proses ini mengalami pengulangan hingga mencapai kelembapan yang diinginkan. Kemudian daun teh dipanaskan (*firing*) hingga kering (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Dalam metode *Pan-fried*, daun teh segar yang telah dipetik dikeringkan dalam wajan yang besar hingga mencapai kelembapan yang diinginkan. Longjing tea, jenis teh hijau terkenal dari Hangzhou China merupakan salah satu varietas yang mengalami proses *pan fired*. Langkah ini menciptakan cita rasa khas seperti kacang panggang pada teh. Setelah menghentikan oksidasi, daun teh dikeringkan sepenuhnya melalui pemanasan akhir (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Tumble-dried merupakan metode pengeringan teh yang melibatkan silinder yang dipanaskan, di mana daun teh ditempatkan untuk mengalami proses tersebut. Gunpowder adalah jenis teh hijau asal China yang diproduksi menggunakan teknik *tumble dried* (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Oven-dried merupakan bentuk yang lebih canggih dari *basket fired*, yaitu menggunakan panas dari uap yang disalurkan ke daun teh menggunakan oven.

Pendekatan ini memfasilitasi produksi teh dengan skala yang besar dan lebih efisien secara waktu (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Metode setaming umumnya diterapkan dalam pembuatan teh hijau di Jepang, menggunakan dua jenis steamer yaitu mesin yang berputar dan conveyor belt steamer. Teh yang dihasilkan melalui proses ini memiliki warna yang lebih fresh dan mirip dengan teh segar. Ketika eh diseduh maka akan mengeluarkan aroma khas dari sayuran kukus (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Dalam produksi teh jepang, terdapat metode unik yang melibatkan penutupan tanaman teh dengan kasa atau tirai bambu sebelum panen, disebut ooshita en. Giyokuro, tencha (teh untuk macha), dan kabusecha termasuk dalam kategori teh hijau premium jepang yang mengikuti proses ini. Untuk giyokuro dan tencha, penutupan tanama dengan kasa dapat mengurangi paparan sinar matahari hingga 60%, dilakukan tiga minggu sebelum panen. Biasanya dimulai pertengahan April, dan panen dilakukan pada minggu pertama atau kedua Mei. Sedangkan Kabusecha mengurangi paparan sinar matahari hanya hingga 40% dengan proses selama 10 hari sebelum panen. Penurunan paparan sinar matahari bertujuan untuk meningkatkan kadar klorofil dalam daun teh, mengurangi tanin, sehingga rasa teh menjadi lebih manis dan tidak pahit (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Dalam pembuatan teh hijau berkualitas tinggi dari daun teh yang masih sangat muda, pemetikan hingga tahap produksi dilakukan secara manual untuk mencegah patah atau rusaknya daun teh yang sangat lembut tersebut (Ratna Somantri & Tanti 2013).

3. Teh Oolong

Teh oolong juga dikenal sebagai teh semi fermentasi, biasanya diproduksi di China bagian Selatan dan Taiwan. Proses pembuatannya melibatkan pengeringan daun teh dengan menjemurnya atau menganginkannya. Setelah itu, daun teh dipersiapkan untuk mengalamiproses oksidasi, serupa dengan pembuatan teh hitam, dengan perbedaan bahwa pada teh oolong, oksidasi dilakukan sebagian. Durasi oksidasi bervariasi tergantung pada pembuatnya, menghasilkan berbagai jenis teh oolong. Teh ini dibagi menjadi empat kategori besar berdasarkan tingkat oksidasi:

50-65%, 20-30%, 30-40%, dan 60-70%. Ketika Tingkat oksidasi meningkat, maka warna daun teh akan semakin gelap. Selanjutnya, bentuk daun teh dibuat menjadi gumpalan daun yang terpilin (Ratna Somantri & Tanti 2013).

4. Teh Hitam

Teh hitam merupakan varietas teh yang mengalami oksidasi total, mengakibatkan daun berwarna coklat gelap dan minumannya memiliki rentang warna dari coklat sampai coklat pekat. Proses oksidasi mempengaruhi rasa dari daun teh segar yang awalnya pahit menjadi sedikit manis dan juga memberikan kesan kesat pada hasil seduhan (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Proses pembuatan teh hitam dimulai dengan merendam daun teh segar dalam ruangan ada sirkulasi udaranya selama beberapa jam. Setelah itu, daun teh mengalami tahap rolling, yang bertujuan untuk menghancurkan sel-sel di dalam teh dan meratakan enzim ke seluruh permukaannya. Enzim ini memiliki peran penting dalam menginisiasi oksidasi daun teh. Tekanan yang diterapkan pada tahap rolling disesuaikan dengan jenis daun yang digunakan. Untuk teh seperti Darjeeling yang dipetik dari pucuk daun pada musim semi dan bertekstur sangat lembut, tekanan pada proses rolling dilakukan lebih lembut dibandingkan dengan teh yang sama namun dipetik pada musim panas sehingga daunnya lebih tebal. Setelah itu daun teh dibiarkan hingga mengalami oksidasi, lalu dikeringkan sampai kadar air hilang (Ratna Somantri & Tanti 2013).

Proses produksi di atas kerap disebut "proses ortodoks". Proses ini kemudian dimodifikasi menggunakan mesin CTC (crush tear curl). Daun teh dihancurkan, dicabik, dan digulung menjadi bentuk kecil, baru kemudian masuk ke tahap rolling. Setelah itu, daun teh dibiarkan mengalami oksidasi sebelum dikeringkan hingga kelembapannya hilang. Proses CTC merupakan metode produksi teh dalam skala massal. (Ratna Somantri & Tanti 2013).

2.1.3. Kandungan teh

Daun dari *Camellia sinensis* memiliki komposisi yang kaya akan senyawa bioaktif seperti senyawa fenolik (asam fenolat, flavonoid, dan tanin), alkaloid (metilksantin), dan nutrisi (karbohidrat, protein, dan mineral) (Sharma et al, 2021). (D. Chen et al., 2020). Komposisi daun kering memiliki 1 hingga 4% asam amino (26 asam amino yang sudah dilaporkan dalam literatur) dan 18 hingga 36% senyawa fenolik, termasuk flavonol, flavonoid, dan asam fenolat 12 hingga 24% senyawa fenolik ini berupa katekin (S. Chen et al., 2021). Komposisi fenolik dari *Camellia sinensis* bertanggung jawab atas aktivitas antioksidannya. Sifat ini memainkan peran penting bagi kesehatan manusia, karena menghambat atau mengurangi efek penuaan dan penyakit kronis-degeneratif (Shang et al., 2021).

Senyawa fenolik, dapat bervariasi sesuai dengan faktor geografis, genetik, ekologis, fisiologis, dan pengolahan. Proses pengolahan memainkan peran penting dalam komposisi fenolik, karena beberapa senyawa hanya terbukti ada setelah proses fermentasi dari daun teh, serta beberapa senyawa terdegradasi selama proses ini. Contohnya adalah komposisi theanine yang lebih tinggi terkandung dalam teh hijau (tanpa fermentasi) dibandingkan dengan teh hitam (fermentasi penuh) (Abdel Azeem et al., 2020). Dan juga semakin gelap tehnya, semakin tinggi konsentrasi theaflavin yang terkandung didalamnya (diperoleh dalam proses oksidasi daun).

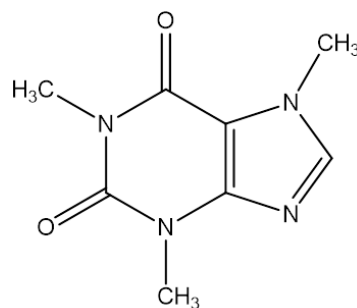
Menurut (Q. Chen et al., 2019) dan (Sun et al., 2019) hasil penelitian yang mereka lakukan menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dari teh memiliki aktivitas fisiologi, seperti mengatur kesehatan usus, meningkatkan imunosupresi yang diinduksi dan mengurangi obesitas pada tikus. Senyawa bioaktif dapat mengalami modifikasi selama proses pengolahan teh karena paparan oksigen dapat menyebabkan degradasi beberapa senyawa kimia. Oleh karena itu, teh diklasifikasikan berdasarkan proses pengolahannya, di mana perubahan utama terjadi dalam tingkat oksidasi yang mengubah karakteristik kimianya (S. Chen et al, 2021).

Di antara senyawa yang terkandung di dalam teh, senyawa yang paling banyak adalah asam amino, metilksantin (kafein dan teobromin), dan theanine (yang mewakili 60-70% dari total asam amino dalam daun teh), serta senyawa

fenolik seperti asam fenolat, katekin, dan flavonoid (Fang et al., 2017). Namun, perlu dicatat bahwa variasi dalam konsentrasi senyawa bioaktif dipengaruhi oleh tahapan pengolahan teh

Selain senyawa fenolik, *Camellia sinensis* mengandung metabolit sekunder yang berasal dari nukleotida purin, khususnya, metilksantin yang larut dalam air dan dapat merangsang sistem saraf pusat (L. Zhang et al., 2019). Di antara metilksantin dalam teh, terdapat kafein dalam konsentrasi yang tinggi dan teobromin, yang bertanggung jawab atas kualitas teh (Teng et al., 2020).

2.2 Kafein



Gambar 3. Struktur kafein

Kafein merupakan sejenis alkaloid purin yang berasal dari tumbuhan seperti biji kopi dan daun teh (Yoon et al., 2023). Kafein juga ditemukan dalam makanan dan minuman lainnya, seperti biji guarana, coklat, minuman energi, dan soft drink (Kanlaya et al., 2023). Kafein memiliki nama kimia 1,3,7-trimethylxanthine dan rumus molekul $C_8H_{10}N_4O_2$ dengan berat molekul 194,19 g/mol. Pemerian kafein berupa serbuk atau bentuk jarum mengkilat putih, biasanya menggumpal, tidak berbau, rasa pahit. Titik lebur antara 235°C – 237°C . Kafein memiliki kelarutan 1:60 dengan air, 1:1 dengan air panas ($>40^{\circ}\text{C}$), 1:75 dengan etanol, 1:7 dengan kloroform.

2.2.1. Efek farmakologi

Kafein merupakan senyawa aktif yang umum dikonsumsi di seluruh dunia (Gaspar et al., 2024). Kadar kafein dalam satu tumbuhan yang sama belum tentu mempunyai kadar yang senilai, hal ini dikarenakan perbedaan lingkungan tumbuh tanaman juga proses pengolahan dari tanaman teh (Gonçalves Bortolini et al., 2021). Kafein dapat menstimulasi dopamin dan asetil kolin di otak yang membuat reseptor adenosin terhambat sehingga membuat fungsi kognitif tubuh meningkat (Arroyave-Ospina et al., 2023).

Setelah kafein masuk ke dalam tubuh maka akan diabsorpsi melalui usus kemudian diedarkan ke seluruh tubuh dengan kecepatan yang berbeda disetiap individu. Kafein akan bereaksi sekitar 30-120 menit. Proses metabolisme kafein terjadi di hati kemudian proses eliminasi kafein dari tubuh berkisar 4 sampai 5 jam setelah masuk ke dalam tubuh (Kanlaya et al., 2023).

Pada dosis normal kafein memiliki efek stimulan yang berfungsi untuk meningkatkan kewaspadaan, meningkatkan fungsi kognitif dan juga menjadi dorongan energi ekstra. Namun dalam dosis tinggi kafein dapat menimbulkan efek samping seperti rasa cemas, gelisah, sulit tidur, menaikkan tekanan darah, mual, dan bahkan kejang (Gaspar et al., 2023). Regulasi dari Food Drug Administration (FDA) menyatakan bahwa dosis kafein yang diizinkan berada pada rentang 150-200 mg/hari, sedangkan berdasarkan peraturan BPOM nomor 24 tahun 2023 150 mg/hari dan 50 mg/sajian merupakan batas maksimum kafein dalam makanan dan minuman adalah

2.2.2. Analisis kafein dalam teh

Proses analisis kafein di dalam teh meliputi tahapan pengumpulan sampel, determinasi sampel, ekstraksi dan preparasi sampel, pembuatan larutan baku, optimasi kondisi analisis, validasi metode, dan penetapan kadar. Banyak metode analisis kafein antara lain, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), Kromatografi Gas (GC), Spektrofotometri UV-VIS, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Tandem Mass Spectrometry, Gravimetri, dan Kromatografi Lapis Tipis.

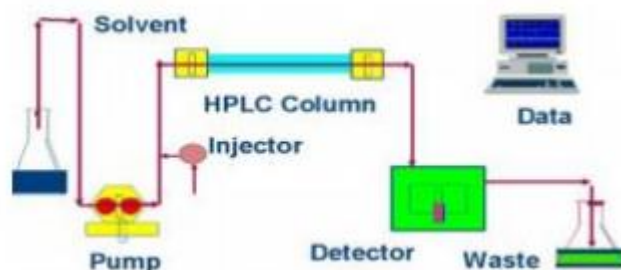
2.2.3. Metode ekstraksi Kafein dalam teh

Ada beberapa cara untuk ekstraksi kafein dalam teh dan yang paling baik ekstraksinya berdasarkan kelarutan dan sifat fisikokimianya, penelitian (Guo et al., 2018) ekstraksi yang digunakan adalah refluks dan didapatkan kadar kafein sebesar 54.6 ± 0.4 , penelitian (Jeon et al., 2017) menggunakan ekstraksi dengan air panas dengan suhu 80°C selama 1 jam dan didapatkan konsentrasi kafein sebesar 32.0 ± 2.8 , penelitian (Zapata et al., 2020) menggunakan ekstraksi CO_2 dan mendapatkan konsentrasi kafein sebesar 14.5 ± 0.8 , dan masih banyak lagi ekstraksi yang dapat digunakan seperti yang terlampir.

2.3 KCKT

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) adalah kromatografi yang dapat digunakan untuk memisahkan senyawa campuran dan dapat digunakan pada senyawa biokimia maupun menganalisis senyawa kimia untuk identifikasi, kuantifikasi, dan purifikasi senyawa individu yang didapat dari senyawa campuran yang dianalisis tersebut (Weston & Brown, 1997).

2.3.1. Komponen KCKT



Gambar 4. Diagram alir KCKT

Menurut Gandjar dan Rohman (2007), instrument KCKT umumnya terdiri dari delapan komponen utama, yaitu wadah fase gerak, system penghantaran fase gerak, alat untuk memasukkan sampel, kolom, detector, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung, dan computer atau integrator.

Wadah fase gerak harus bersih atau inert. Wadah kosong atau labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Wadah ini mampu menampung satu hingga dua liter pelarut. Sebelum digunakan, fase gerak harus bebas dari gas yang ada di dalamnya, karena keberadaan gas dapat menyebabkan pengumpulan komponen lain, terutama di pompa dan detektor yang dapat mengganggu analisis.

Pompa merupakan perangkat yang digunakan untuk menggerakkan fase gerak dan sampel yang diinjeksi menuju kolom. Pompa biasanya dibuat dari bahan inert seperti kaca, baja tahan karat, dan Teflon. Pompa yang digunakan idealnya mampu memberikan tekanan hingga 5000 psi dan mengalirkan fase gerak dengan laju aliran 20mL/menit.

Sampel cair dari larutan disuntikkan langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari baja tahan karat dan katup Teflon, yang dilengkapi dengan loop sampel dan kelebihan akan dibuang. Saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak melewati loop sampel dan mengalirkan sampel ke dalam kolom. Penyuntikan ini presisi, mudah digunakan untuk otomatisasi dan sering digunakan untuk autosampler pada KCKT.

Kolom adalah tempat terjadinya proses pemisahan karena berisi fase diam. Dalam kolom KCKT terdapat kolom pelindung yang berfungsi untuk memperpanjang masa penggunaan kolom dengan mencegah ikatan kuat yang tidak dapat dipulihkan antara partikel, kontaminan dari pelarut, dan komponen sampel dengan fase diam. Kolom pelindung umumnya memiliki kemasan yang sama dengan kolom utama, tetapi terdiri dari partikel yang lebih keras, lebih besar (20-40 μm), dan bukan bahan berpori. Kolom pelindung mampu menahan zat terlarut yang dapat menyumbat kolom utama.

Banyak detektor yang digunakan dan diterapkan dalam metode KCKT, masing-masing dengan kelebihan dan kekurangan. Idealnya, detektor harus memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi. Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi dua golongan: detektor universal, yang mendeteksi zat secara umum tanpa spesifisitas atau selektivitas, seperti detektor indeks bias dan

detektor spektrofotometri massa, dan detektor spesifik, yang hanya mendeteksi analit tertentu dengan selektivitas tinggi, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan detektor elektrokimia.

2.3.2. Kelebihan KCKT

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah teknik analisis kimia yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur komponen-komponen dalam sampel cairan. Berikut adalah beberapa kelebihan dari Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT):

1. Resolusi Tinggi

KCKT memiliki kemampuan resolusi yang tinggi, yang memungkinkan pemisahan yang efisien dari berbagai komponen dalam sampel yang kompleks.

2. Kecepatan dan Efisiensi Tinggi

KCKT memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik kromatografi cair konvensional. Ini disebabkan oleh penggunaan kolom yang lebih kecil dan partikel pembawa yang lebih kecil, sehingga meningkatkan efisiensi pemisahan.

3. Sensitivitas Tinggi

KCKT memiliki sensitivitas deteksi yang tinggi, memungkinkan deteksi dan kuantifikasi komponen dalam konsentrasi rendah.

4. Pemisahan Multi-komponen

KCKT dapat digunakan untuk memisahkan dan menganalisis sejumlah besar senyawa yang berbeda dalam satu analisis, membuatnya sangat berguna untuk sampel yang kompleks.

5. Aplikasi Luas

KCKT dapat digunakan untuk menganalisis berbagai jenis senyawa, termasuk senyawa organik, biomolekul, obat-obatan, pigmen, dan banyak lagi.

6. Automatisasi

KCKT dapat dengan mudah diotomatisasi, memungkinkan analisis yang konsisten dan efisien dengan minimal intervensi manusia.

7. Presisi dan Reproduksiabilitas Tinggi

KCKT memberikan hasil yang konsisten dan dapat diulang dengan tingkat presisi yang tinggi.

8. Pemeliharaan Kolom yang Lebih Lama

KCKT dapat menggunakan kolom yang tahan lama dan partikel pembawa yang stabil, sehingga menghasilkan umur kolom yang lebih panjang.

Penting untuk diingat bahwa kelebihan HPLC dapat bervariasi tergantung pada jenis analisis yang dilakukan dan karakteristik sampel yang dianalisis.

KCKT memiliki keuntungan dibandingkan Gas Chromatography (GC) dimana penggunaan KCKT tidak harus untuk analit yang bersifat mudah menguap, sehingga makromolekul juga dapat dianalisis oleh KCKT (Dybowski et al., 2023).

2.3.3. Uji kesesuaian sistem

Uji kesesuaian sistem dalam KCKT bertujuan untuk meverifikasai resolusi dan presisi, serta memastikan bahwa metode tersebut dapat memberikan hasil dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Menurut Center for Drug Evaluation and Research (CDER), persyaratan uji kesesuaian sistem untuk kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dianggap terpenuhi jika :

Tabel 1. Parameter uji kesesuaian sistem

PARAMETER	BATAS
Kapasitas kolom (k')	$1 \leq k' \leq 10$
Waktu Retensi (RT)	≥ 1
Resolusi (R_s)	≥ 2
Faktor Pengekoraan (T_f)	$\leq 1,5$
Angka Lempeng Teoritis	> 2000

Kromatografi memungkinkan pemisahan dan kuantifikasi secara bersamaan dengan Tingkat akurasi dan sensitivitas yang tinggi. Namun, untuk memisahkan

senyawa dalam matriks kompleks seperti teh, kopi, dan coklat, diperlukan optimisasi sistem, KCKT karena banyaknya senyawa yang harus dipisahkan. Parameter seperti komposisi fase gerak, laju alir, dan pH fase gerak dapat dioptimalkan untuk mencapai kondisi analisis terbaik (Zia et al., 2023).

Sistem KCKT yang baik untuk digunakan dalam penetapan kadar Kafein dalam teh adalah sistem yang memunculkan waktu retensi paling sedikit, Adapun beberapa acuan yang dapat dipakai yaitu penelitian (Viana et al., 2018) dengan kolom C18, fase gerak Asam fosfat 0,1% : asetonitril (70:30), detector UV, rentang 220 nm, volume injek 20 µL, laju alir 1 mL/menit, dan waktu retensi di 4 menit; kemudian penelitian (Baek et al., 2022) dengan kolom C18, fase gerak air : asam asetat : methanol (79:1:20), pada rentang 280 nm, volume injek 10 µL, laju alir 0.9 mL/menit dan waktu retensi di 10 menit; kemudian penelitian (Azevedo et al., 2019) menggunakan kolom C18, fase gerak A : metanol B : air : asam asetat (99:1), dengan detector PDA, volume injek 20 µL, laju alir 1 mL/menit dan waktu retensi di 7 menit ; dan sistem-sistem yang lain yang terlampir.

2.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah persyaratan dasar untuk memastikan kualitas dan keandalan terhadap parameter tertentu, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan sesuai tujuannya. Berdasarkan ICH parameter validasi meliputi: spesifisitas, linieritas, kisaran, batas deteksi, batas kuantifikasi, presisi, akurasi, ketahanan dan kesesuaian sistem.

2.4.1. Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan metode analisis untuk mengidentifikasi dan mengkuantifikasikan analit dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel. Pada metode KCKT selektivitas dinyatakan dengan perbandingan antara waktu retensi baku dengan sampel dan juga dilihat dari resolusi (R_s) yang menyatakan keterpisahan dua senyawa atau puncak yang berdekatan dalam kromatogram, dikatakan selektif jika nilai $R_s \geq 1,5$.

2.4.2. Linieritas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon (y) yang proporsional dengan konsentrasi (x) analit pada rentang yang diberikan. Secara sistematis linearitas ditunjukkan dengan persamaan garis sebagai berikut:

$$y = bx + a$$

Keterangan:

b = slope

a = intersep atau perpotongan sumbu y

Dari data yang diperoleh, nilai koefisien korelasi (r) yang baik atau yang memenuhi persyaratan yaitu yang mendekati 1 atau $r = 1$

2.4.3. Batas Deteksi (Limit of Detection LOD)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas yang memberikan respon blanko ditambah tiga simpangan blanko. LOD dapat dihitung dari garis dan standar deviasi kurva standar yang diperoleh yaitu dengan menggunakan rumus:

$$BD = \frac{3 \times SD}{b}$$

Keterangan:

SD = Standar deviasi kurva standar (Sy/x)

b = Slope

2.4.4. Batas Kuantitasi (Limit of Quantification LOQ)

Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi dengan rumus:

$$BK = \frac{10 \times SD}{b}$$

Keterangan:

SD = Standar deviasi kurva standar (Sy/x)

b = Slope

2.4.5. Presisi

Presisi merupakan ukuran kedekatan antara serangkaian hasil analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel homogen yang sama. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X - x)^2}{n - 1}}$$

$$\%RSD = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

Keterangan:

RSD = Standar Deviasi Relatif/ simpangan baku relatif

SD = Standar Deviasi/ simpangan baku

X = Kadar hasil pengukuran

x = Rata-rata kadar hasil pengukuran

n = Jumlah pengujian

2.4.6. Akurasi

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau ketepatan antara nilai tertukur dengan nilai sebenarnya atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan penambahan analit pada suatu sampel. Akurasi dapat ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi dan metode adisi .

$$\%Rec = \frac{Ch}{Cs} \times 100\%$$

Keterangan:

% Rec = % perolehan kembali

Ch = Kadar analit yang diperoleh

Cs = Kadar analit teoritis