

ANALISIS KADAR KAFEIN PADA PRODUK BUBUK KOPI MURNI YANG DIHASILKAN DI KABUPATEN PEKALONGAN MENGGUNAKAN METODE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

ANALYSIS OF CAFFEINE CONTENT IN PURE COFFEE POWDER PRODUCTS PRODUCED IN KABUPATEN PEKALONGAN USING THE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD

Alfa Izzatina Rahmawati¹⁾, Wirasti²⁾, Herni Rejeki³⁾

^{1,2,3)} Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Pekajangan Pekalongan, Jl. Ambokembang No.8 Kedungwuni, Kabupaten Pekalongan, Indonesia

*E-mail : alfa.izzatina@gmail.com

ABSTRAK

Kafein termasuk salah satu jenis alkaloid golongan metil xantin yang banyak terdapat dalam kopi. Efek kafein timbul akibat adanya stimulasi pada sistem syaraf pusat. Efek samping lain bila kafein dikonsumsi secara berlebihan adalah menyebabkan rasa gugup, gelisah, tremor, insomnia, hipertensi, mual serta kejang. Berdasarkan FDA (Food and Drug Administration), dosis kafein yang diizinkan adalah 100-200 mg/hari. Sedangkan menurut SNI 01-7152-2006, batas maksimal dosis kafein pada makanan dan minuman ialah 150 mg/hari atau 50 mg/sajian. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar kafein dalam produk bubuk kopi murni yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan dengan menggunakan metode HPLC. Metode HPLC yang digunakan adalah HPLC fase terbalik dengan fase diam oktadesil silika C₁₈ dan fase gerak dari campuran pelarut aquabidestilata dan metanol (50:50). Kecepatan alir yang digunakan adalah 2,0 mL/menit dengan volume injeksi 20 µL pada detektor UV 274 nm. Jumlah sampel yang dianalisis adalah 13 produk bubuk kopi murni. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa kadar kafein dalam 13 produk bubuk kopi murni yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan yang dianalisis telah memenuhi syarat SNI 01-7152-2006.

Kata Kunci : Kafein, Kopi, Kabupaten Pekalongan, HPLC fase terbalik

ABSTRACT

Caffeine in one of the alkaloids of methyl xanthine group which is widely found in coffee. The effects arise due to stimulation of the central nervous system. The other side effects if caffeine is consumed in excess is causing nervousness, anxiety, tremors, insomnia, hypertension, nausea and seizures. Based on Food and Drug Administration (FDA), a permitted dose of caffeine is 100-200 mg/day. Whereas according to SNI 01-7152-2006, the maximum limit of caffeine dose in food and drinks is 150 mg/day or 50 mg/serving. This study aims to determine the caffeine content in pure coffee powder products produced in *Kabupaten Pekalongan* using the HPLC method. The method used is the reverse phase HPLC with the stationary phase of C₁₈ octadesyl silica and the mobile phase of a mixture of aquabidestilate and methanol (50:50). The flow rate used is 2.0 mL / min with an injection volume of 20 µL at a UV detector of 274 nm. Moreover, 13 pure coffee powder products were taken as the sample . Based on the result, it stated a caffeine content of all samples has fulfilled SNI 01-7152-2006 requirements.

Keywords : *Caffeine, Coffee, Kabupaten Pekalongan, Reverse phase HPLC*

PENDAHULUAN

Dewasa ini, kopi menduduki peringkat terbesar kedua untuk dikonsumsi setelah air. Kopi merupakan sejenis minuman yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Proses pembuatan kopi adalah dengan cara pengolahan dan ekstraksi biji kopi (Fatoni, 2015).

Kabupaten Pekalongan merupakan salah satu daerah penghasil kopi di Indonesia. Jenis kopi yang dibudidayakan di Kabupaten Pekalongan adalah Kopi Arabika dan Kopi Robusta. Kandungan kimia yang terdapat dalam kopi adalah kafein, asam klorogenat, trigonelin, karbohidrat, lemak, asam amino, asam organik,

aroma volatil dan mineral (Yuwono dan Elok, 2017).

Salah satu kandungan dari kopi adalah kafein. Kafein merupakan jenis alkaloid kelompok senyawa metilxantin yang termasuk ke dalam derivat xantin. Adanya perbedaan kadar kafein pada masing-masing produk kopi memungkinkan adanya perbedaan pengaruhnya bagi kesehatan (Weinberg, dkk., 2010).

Kafein pada kopi memiliki efek farmakologis secara klinis, diantaranya dapat menstimulasi susunan saraf, merelaksasi otot polos terutama pada otot bronkus dan menstimulasi otot jantung. Konsumsi kafein secara berlebihan dapat menimbulkan efek samping, seperti gugup, mual, gelisah kejang dan insomnia. Berdasarkan FDA (*Food and Drug Administration*), dosis kafein yang diizinkan adalah 100-200 mg/hari, sedangkan menurut SNI 01-7152-2006 batas maksimal dosis kafein pada makanan dan minuman ialah 150 mg/hari dan 50 mg/sajian (Maramis, dkk., 2013).

Kopi merupakan salah satu jenis minuman yang digemari oleh masyarakat Indonesia dari semua kalangan. Bagi para penikmat kopi biasanya mereka dapat meminum kopi sebanyak 3-4 kali dalam sehari (Maramis, dkk., 2013). Kurangnya informasi terkait kandungan kafein dalam kopi menyebabkan tidak terkontrolnya konsumsi kafein bagi para penikmat kopi.

Kadar kafein dalam setiap produk kopi harus ditentukan, sehingga dapat diketahui oleh masyarakat yang mengkonsumsi kopi bahwa kadar kafein yang terkandung dalam kopi tersebut masih berada pada batas normal yang diizinkan menurut SNI atau tidak. Pada kemasan produk kopi yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan belum tercantumkan berapa kadar kafein yang terkandung dalam setiap produknya, sehingga perlu dilakukan analisis kadar kafein dalam setiap produk kopi yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan. Hasil penelitian yang diperoleh diharapkan dapat digunakan oleh produsen kopi agar mencantumkan nilai kadar yang dihasilkan pada kemasan produk kopinya, sehingga dapat menjadikan masyarakat lebih bijak dalam mengonsumsi kopi tersebut. Terdapat banyak metode analisis yang dapat digunakan untuk analisis kadar suatu senyawa. Salah satunya adalah metode HPLC.

Metode HPLC dapat digunakan untuk analisis sampel yang mengandung senyawa kafein seperti kopi, teh, formulasi farmasi dan minuman

berenergi. Metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) merupakan suatu metode yang digunakan untuk analisis kuantitatif dengan mengetahui kadar suatu senyawa dalam zat tertentu. Metode HPLC dipilih karena memiliki daya pisah yang baik, peka, kolom dapat digunakan kembali dan dapat digunakan untuk analisis molekul besar maupun kecil (Harmita, 2015).

Berdasarkan informasi tersebut, maka peneliti bermaksud melakukan penelitian analisis kadar kafein dalam produk bubuk kopi murni yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan dengan menggunakan metode HPLC.

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah seperangkat alat HPLC Fase terbalik dengan detektor UV, seperangkat komputer, kolom oktadesil silika C₁₈ dimensi 250 x 4,6 mm dan ukuran pori 5 µm, printer, spektrofotometer UV-Vis, timbangan analitik, syringe untuk HPLC, spuit injeksi 1 mL, syringe filter ukuran pori 0,45 µm, mikropipet 100 µL dan 1000 µL, blue tip dan yellow tip, tabung sentrifuge 15 mL, seperangkat alat reflux, waterbath, ultrasonikator, sentrifugator, vortex dan alat-alat gelas.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah 13 sampel produk bubuk kopi murni yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan, metanol for HPLC, kloroform p.a, aquabidestilata, aquadest, baku kafein p.a, NaOH p.a, seng asetat p.a, kalium ferosianida p.a.

Pembuatan fase gerak

Pelarut yang digunakan untuk pembuatan fase gerak pada penelitian ini adalah menggunakan campuran pelarut aquabidestilata dan metanol dengan perbandingan 50:50. Larutan fase gerak kemudian disaring menggunakan syringe filter ukuran pori 0,45 µm yang sedikit dimiringkan, lalu diudarakan selama 10 menit menggunakan ultrasonikator pada suhu 36°C.

Pembuatan pelarut

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan campuran pelarut aquabidestilata dan metanol dengan perbandingan 50:50. Larutan kemudian disaring menggunakan syringe filter ukuran pori 0,45 µm yang sedikit dimiringkan.

Pembuatan larutan induk kafein

Pembuatan larutan induk kafein ini adalah dengan cara menimbang baku kafein secara seksama sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan pelarut aquabidestilata dalam labu takar 10 mL hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/mL.

Pembuatan larutan seri baku kafein

Pembuatan larutan seri kafein ini adalah dengan cara mengambil larutan induk kafein sesuai dengan konsentrasi masing-masing, yaitu 10, 25, 50, 100, 150, 200 dan 250 µg/mL. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan dilarutkan dengan pelarut aquabidestilata hingga tanda batas dan disaring menggunakan syringe filter ukuran pori 0,45 µm yang sedikit dimiringkan lalu diudarkan selama 10 menit menggunakan ultrasonikator pada suhu 36°C.

Penentuan panjang gelombang serapan maksimum kafein

Penentuan panjang gelombang maksimum yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan cara mengambil larutan baku kafein seri konsentrasi 25 dan 50 µg/mL. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan dilarutkan dengan pelarut aquabidestilata hingga tanda batas. Larutan dibaca absorbansinya pada rentang panjang gelombang 200-300 nm menggunakan spektrofotometer UV/Vis. Panjang gelombang maksimum dipilih dari seri konsentrasi yang memberikan puncak gelombang paling tinggi. Nilai panjang gelombang maksimum tersebut akan digunakan untuk mendeteksi kafein pada sistem HPLC.

Penetapan kurva kalibrasi

Penetapan kurva kalibrasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan cara sejumlah 20 µL dari masing-masing seri konsentrasi larutan baku diinjeksikan ke dalam sistem HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dengan kecepatan alir 2,0 mL/menit selama 3 menit pada detektor UV 274 nm. Hasil yang akan diperoleh adalah berupa kromatogram yang akan menunjukkan nilai AUC (*Area Under Curve*) baku kafein untuk masing-masing seri konsentrasi larutan baku. Nilai AUC pada masing-masing larutan ini kemudian dihubungkan dengan masing-masing seri konsentrasi larutan baku sehingga diperoleh suatu persamaan regresi linier

yang menyatakan hubungan konsentrasi kafein vs AUC. Selanjutnya, ditentukan nilai koefisien korelasi dengan persamaan $y=bx+a$. Persamaan regresi linier ini akan digunakan untuk menghitung kadar kafein pada masing-masing sampel.

Preparasi sampel

Dua gram (2 g) masing-masing sampel produk bubuk kopi murni dari 13 sampel produk bubuk kopi murni yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan direflux selama 1 jam dengan pelarut aquadest sebanyak 150 mL. Kemudian, sejumlah 1 mL larutan kopi hasil ekstraksi ditampung ke dalam tabung sentrifuge dan ditambahkan dengan seng asetat 1,37 M dan kalium ferosianida 0,35 M masing-masing sebanyak 500 µL lalu divortex. Kemudian disentrifugasi selama 5 menit sampai filtrat terpisah menggunakan sentrifugator dengan kecepatan 5000 rpm. Filtrat yang diperoleh ditambah 40 µL NaOH 10 N kemudian diekstraksi dengan 5 mL kloroform sebanyak dua kali lalu diuapkan dengan menggunakan waterbath suhu 90°C hingga didapat kristal kafein. Kemudian kristal kafein yang diperoleh dilarutkan dengan 1 mL pelarut dan disaring menggunakan syringe filter ukuran pori 0,45 µm yang sedikit dimiringkan. Lalu diudarkan selama 10 menit menggunakan ultrasonikator pada suhu 36°C.

Analisis kualitatif

Analisis kualitatif ini dilakukan dengan cara melakukan pengujian secara organoleptis pada masing-masing sampel produk bubuk kopi yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan dan melakukan perbandingan waktu retensi antara sampel yang digunakan dengan baku kafein pada kondisi kromatografi yang sama.

Analisis kuantitatif

Analisis kuantitatif yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan cara larutan sampel yang telah dipreparasi diinjeksikan sejumlah 20 µL ke dalam sistem HPLC dengan menggunakan fase diam oktadesil silika C₁₈ dan fase gerak dari campuran pelarut aquabidestilata dan metanol (50:50). Kecepatan alir yang digunakan adalah 2,0 mL/menit pada kondisi isokratik selama 3 menit dengan detektor UV pada panjang gelombang maksimum 274 nm. Dilakukan replikasi sebanyak dua kali. Hasil yang akan diperoleh adalah berupa kromatogram yang akan menunjukkan nilai AUC

(*Area Under Curve*). Kadar kafein masing-masing sampel dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh.

Analisis data

Analisis data yang akan dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan perhitungan kadar kafein dengan cara memasukkan nilai AUC sampel ke dalam persamaan regresi linier yang telah diperoleh. Analisis kadar kafein dalam produk bubuk kopi murni yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan dinyatakan dalam mg (kadar kafein dalam satu kali penyajian atau tiap 2 gram (2 sdt) dan kadar kafein dalam sehari atau empat kali penyajian).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah produk bubuk kopi murni yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan. Dalam penelitian ini digunakan sebanyak 13 sampel produk bubuk kopi murni yang didapatkan secara acak dari berbagai Kecamatan di Kabupaten Pekalongan. Produk bubuk kopi murni yang beredar lebih banyak berasal dari Kecamatan Petungkriyono. Jenis kopi yang digunakan dalam produksi bubuk kopi murni di Kabupaten Pekalongan adalah Robusta dan Arabika. Tiga belas sampel yang diperoleh adalah produk kemasan dengan berat bersih 100 gram pada masing-masing produk. Dilakukan perlakuan yang sama terhadap masing-masing sampel.

Sebelum dilakukan analisis, semua sampel terlebih dahulu dilakukan penggerusan guna mendapatkan ukuran partikel yang seragam sehingga dapat diasumsikan mempunyai homogenitas yang baik. Pada penelitian ini dilakukan replikasi sebanyak dua kali untuk mendapatkan hasil yang representatif, sehingga sampel yang dianalisis dapat mewakili populasinya. Dari sampel yang didapatkan hanya sebanyak 2 gram dari masing-masing sampel yang digunakan untuk analisis. Penimbangan ini dilakukan secara seksama guna mendapatkan keseragaman bobot yang baik.

Preparasi sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bubuk kopi murni yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan. Pada bubuk kopi murni ini tidak hanya terkandung satu senyawa saja, melainkan juga terdapat beberapa senyawa yang

memiliki molekul besar lainnya. Oleh karena itu, sebelum dilakukan analisis sebaiknya dilakukan preparasi sampel terlebih dahulu. Preparasi sampel dalam penelitian ini dilakukan dengan maksud untuk menghilangkan senyawa lain selain kafein yang dapat mengakibatkan koloid yang memiliki molekul-molekul besar seperti tannin, protein dan lemak yang dapat mengganggu analisis kuantitatif serta dapat menyumbat kolom pada sistem HPLC (Nollet dan Toldra, 2015).

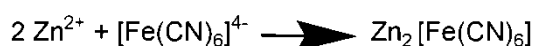
Sebelum dilakukan preparasi, sampel harus dibuat ekstrak terlebih dahulu. Tujuan ekstraksi ini adalah untuk menarik zat aktif atau senyawa kafein keluar dari dalam sel yang berada pada bubuk kopi murni dengan menggunakan cairan penyari (Najib, 2018). Proses ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan metode ekstraksi refluks, dimana ekstraksi refluks adalah metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000).

Pemilihan metode ekstraksi ini adalah berdasarkan sifat komponen kimia yang akan disari dengan sifat larutan penyari yang akan digunakan dan pengaruh suhu. Kafein merupakan alkaloid semi yang memiliki gugus karbonil hidrofilik sehingga dapat larut dalam air yang bersifat polar. Namun, karena jumlah gugus karbonil hidrofiliknya sedikit dan apabila proses ekstraksi yang dilakukan hanya dengan menggunakan pelarut aquadest saja tanpa adanya perlakuan khusus, maka dikhawatirkan hanya sedikit senyawa kafein yang tersari, sehingga perlu dilakukan pemanasan dengan suhu konstan dengan tetap mempertimbangkan titik didihnya agar senyawa kafein dapat tersari secara maksimal dan tidak mengalami kerusakan akibat pemanasan yang terlalu tinggi.

Keunggulan menggunakan metode ini dibandingkan dengan penyeduhan adalah senyawa kafein yang tersari lebih banyak sehingga akan memudahkan analisis yang dilakukan. Lama waktu refluks yang dilakukan adalah selama 1 jam, tidak kurang dari 1 jam agar senyawa kafein yang tersari dapat secara optimal, tidak lebih dari 1 jam agar tidak merusak senyawa kafein yang telah tersari.

Preparasi sampel ini menggunakan reagen seng ferosianida. Reagen seng ferosianida ini berperan sebagai *clarifying agent*, yakni digunakan untuk mengendapkan senyawa dengan

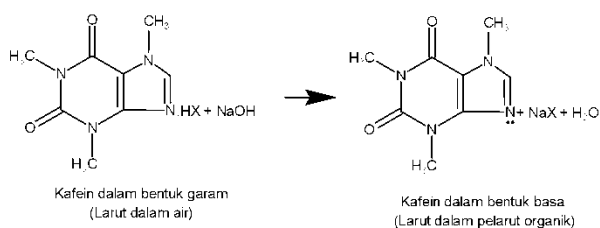
molekul besar selain kafein yang dapat menimbulkan kekeruhan sehingga mengganggu analisis. Dalam penelitian ini, reagen seng ferosianida terbuat dari larutan terpisah. Larutan terpisah ini adalah seng asetat dan kalium ferosianida. Kedua larutan ini ditambahkan secara berturut-turut ke dalam sampel sehingga akan terbentuk suatu endapan. Endapan tersebut adalah seng ferosianida, dimana senyawa dengan molekul besar selain kafein akan teradsorpsi sehingga juga akan ikut mengendap. Selain dapat mengendapkan bahan yang mengakibatkan koloid, reagen seng ferosianida juga dapat mengendapkan zat warna dalam sampel yang dapat mengganggu analisis (Nollet dan Toldra, 2015). Reaksi pembentukan koloid dari pencampuran seng asetat dan kalium ferosianida pada sampel dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 1. Reaksi pembentukan koloid

Pada preparasi sampel ini dilakukan vortex dan sentrifugasi terhadap sampel yang telah ditambahkan reagen seng ferosianida. Tujuan dilakukannya vortex adalah agar terjadi distribusi senyawa ke dalam pelarut. Sedangkan tujuan dilakukannya sentrifugasi adalah untuk memisahkan endapan seng ferosianida yang mengandung koloid dengan filtratnya. Sentrifugasi ini dilakukan pada kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Semakin cepat kecepatan sentrifugasi maka akan semakin meningkatkan sedimen, sedangkan semakin lambat kecepatan sentrifugasi maka akan semakin menurunkan sedimen (Gopala, 2016).

Setelah diperoleh hasil filtrat, selanjutnya ditambahkan larutan NaOH 10 N. Tujuan ditamlehkannya NaOH 10 N adalah agar kafein yang masih berbentuk garam larut air dapat bereaksi dengan basa, sehingga dapat larut dalam fase kloroform (Chrismaaji, 2018). Reaksi ini dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 2. Reaksi pelepasan kafein dari bentuk garam menjadi bentuk basa

Kafein bersifat basa *mono-cidic* yang lemah dan dapat mengalami pemisahan dengan penguapan air. Penambahan pereaksi asam akan terbentuk garam yang tidak stabil, sedangkan dengan penambahan pereaksi basa akan terbentuk garam yang stabil. Kafein akan mudah mengalami penguraian dengan penambahan alkali panas dan akan terbentuk kafeidin (Muchtadi dkk., 2010).

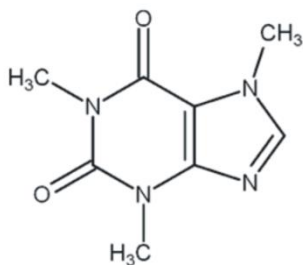
Filtrat yang telah dilakukan pembasaan selanjutnya di ekstraksi dengan menggunakan pelarut kloroform. Pelarut kloroform ini dipilih karena kafein yang sebelumnya berbentuk garam larut air telah dilakukan reaksi pembasaan sehingga akan mudah larut dalam pelarut organik seperti kloroform. Selain itu, kloroform memiliki titik didih yang rendah yaitu 61-62°C sehingga akan mudah menguap dalam pemanasan (Moffat, dkk., 2011). Pemilihan pelarut kloroform untuk proses ekstraksi kafein ini adalah sesuai, hal ini dikarenakan kafein akan lebih banyak terekstrak ke dalam pelarut kloroform dibandingkan dengan pelarut-pelarut lainnya seperti karbon tetraklorida, dietil eter dan n-heksan (Roosenda, 2016).

Selanjutnya fase kloroform hasil ekstraksi diuapkan dengan menggunakan waterbath pada suhu 90°C hingga kering. Suhu 90°C ini dipilih karena pada suhu ini kloroform telah menguap sempurna. Pemilihan suhu ini masih dibawah suhu penguapan kafein agar senyawa kafein murni yang dihasilkan tidak rusak dan tidak mengalami perubahan kadar ketika proses penguapan. Suhu penguapan kafein adalah 178°C (Moffat, dkk., 2011).

Panjang gelombang maksimum

Analisis sampel ini menggunakan analisis HPLC, maka diperlukan suatu panjang gelombang untuk membaca serapan kafein pada sistem HPLC. Sistem HPLC yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan detektor UV sehingga panjang gelombang dalam penelitian ini ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Suatu senyawa harus memiliki gugus kromofor dan auksokrom apabila akan ditetapkan kadarnya secara spektrofotometri UV-Vis. Hal ini dikarenakan kedua gugus tersebut bertanggung jawab dalam penyerapan radiasi ultra violet. Senyawa kafein memiliki gugus kromofor dan auksokrom yang bertanggung jawab dalam penyerapan ultra violet. Struktur kimia kafein dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 3. Struktur kimia kafein

Berdasarkan data yang diperoleh, dipilih panjang gelombang 274 nm karena memberikan puncak gelombang yang lebih tinggi dibandingkan puncak gelombang lainnya. Digunakan panjang gelombang maksimum karena dianggap dengan panjang gelombang ini dapat membaca semua serapan kafein dalam sampel yang dianalisis. Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis sampel adalah sama. Hal ini dimaksudkan agar data yang diperoleh semakin akurat dan mencegah munculnya potensi kesalahan yang dapat terjadi.

Serapan maksimum kafein secara teoritis adalah 273 nm (Moffat dkk., 2011). Selisih pergeseran panjang gelombang yang memberikan serapan kafein pada penelitian dengan panjang gelombang secara teoritis adalah 1 nm. Menurut Synder (2010), pengujian dengan panjang gelombang maksimum dapat digunakan bila panjang gelombang yang memberikan serapan senyawa tersebut tepat atau dalam batas 3 nm dari panjang gelombang yang ditentukan. Oleh karena itu, pergeseran panjang gelombang maksimum pada penelitian ini dapat diterima.

Analisis kualitatif

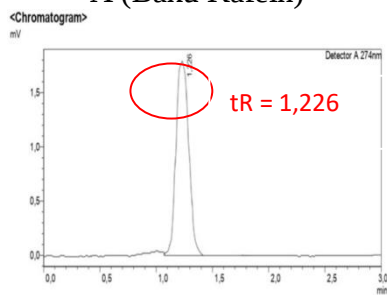
Sebelum dilakukan analisis kuantitatif, terlebih dahulu dilakukan analisis kualitatif, yakni dengan melakukan pengujian secara organoleptis terhadap sampel yang dianalisis dan melakukan perbandingan waktu retensi antara sampel yang digunakan dengan waktu retensi baku kafein pada kondisi kromatografi yang sama.

Pengujian secara organoleptis terhadap masing-masing sampel yang dianalisis menunjukkan hasil yang hampir sama yaitu memiliki rasa dan aroma kopi yang khas pada tiap sampelnya. Sampel kopi arabika memiliki rasa yang lebih khas yaitu sedikit lebih asam dibandingkan dengan kopi robusta yang memiliki rasa pahit. Menurut Blumberg 2010, keunikan rasa asam dan pahit pada kopi dipengaruhi oleh senyawa golongan alkaloid jenis kafein, trigonelina dan asam klorogenat. Kopi arabika

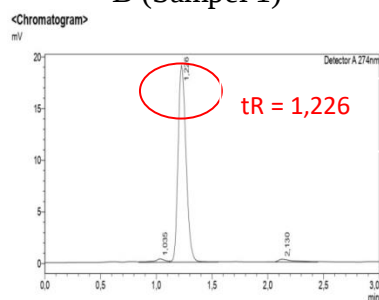
mempunyai kualitas cita rasa yang tinggi dan kadar kafeinnya lebih rendah bila dibandingkan dengan kopi robusta (Rahardjo, 2012). Warna pada sampel produk kopi menunjukkan hasil yang berbeda-beda, ada yang berwarna menyerupai kopi hitam komersial dan ada juga yang mendekati warna coklat. Hal ini dapat terjadi karena pengaruh jenis kopi yang digunakan, dimana kopi arabika memiliki warna cenderung lebih coklat dibandingkan kopi robusta. Kopi robusta memiliki biji berwarna lebih gelap dibandingkan kopi arabika (Yuwono dan Elok, 2017). Selain itu, proses penyangraian juga berpengaruh terhadap warna kopi yang dihasilkan, dimana semakin lama proses penyangraian maka semakin gelap warna kopi yang dihasilkan. Perbedaan variasi suhu pada proses penyangraian biji kopi dapat mengakibatkan terjadinya perubahan sifat fisik seperti peningkatan kerapuhan, penurunan kadar air yang lebih cepat serta mempercepat perubahan warna kegelapan (Nugroho, dkk., 2009).

Perbandingan waktu retensi antara sampel yang digunakan dengan waktu retensi baku kafein dapat dilihat pada gambar kromatogram baku kafein dan kromatogram masing-masing sampel yang terdapat pada gambar berikut.

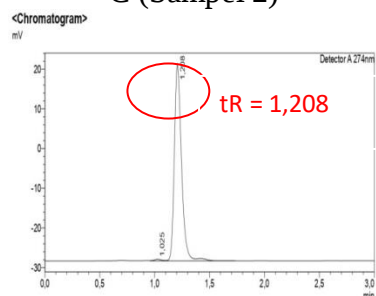
A (Baku Kafein)



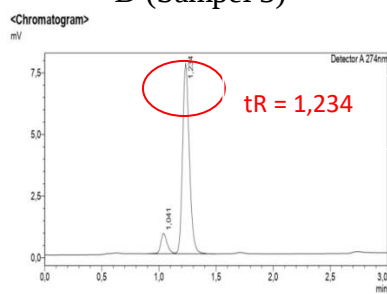
B (Sampel 1)



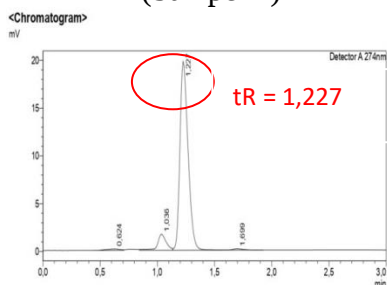
C (Sampel 2)



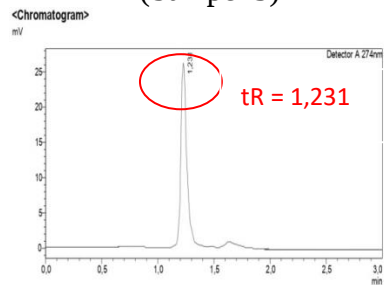
D (Sampel 3)



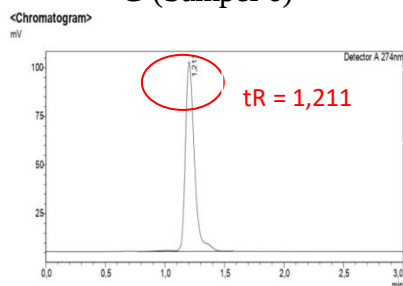
E (Sampel 4)



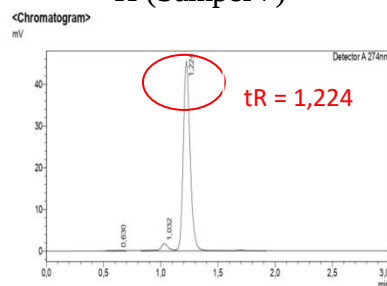
F (Sampel 5)



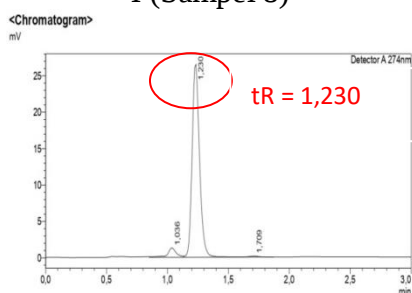
G (Sampel 6)



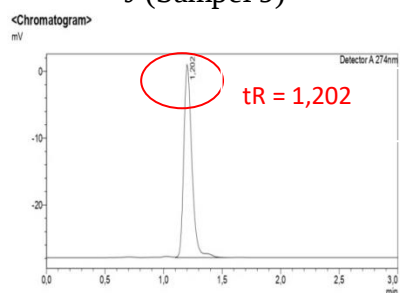
H (Sampel 7)



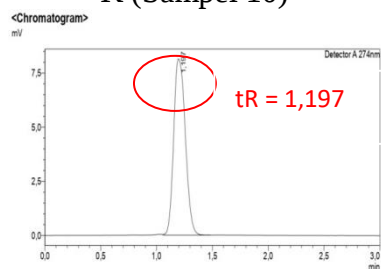
I (Sampel 8)



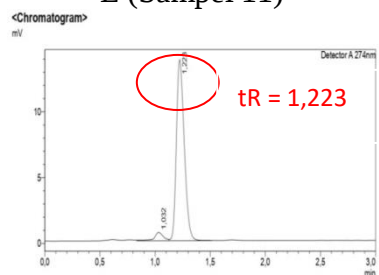
J (Sampel 9)

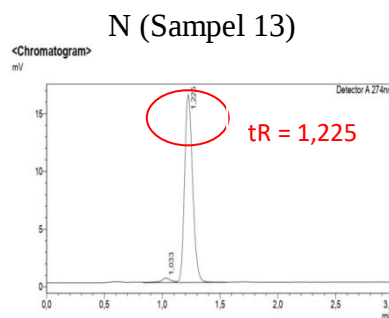
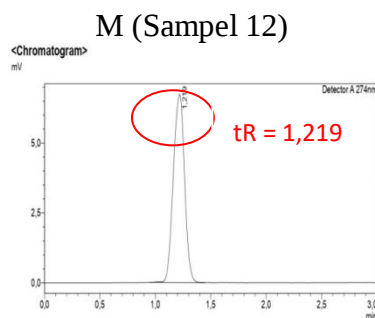


K (Sampel 10)



L (Sampel 11)





Gambar 4. Kromatogram baku kafein (A), Sampel 1 (B), Sampel 2 (C), Sampel 3 (D), Sampel 4 (E), Sampel 5 (F), Sampel 6 (G), Sampel 7 (H), Sampel 8 (I), Sampel 9 (J), Sampel 10 (K), Sampel 11 (L), Sampel 12 (M), Sampel 13 (N)

Data hasil waktu retensi untuk masing-masing sampel dan selisih waktu retensi antara masing-masing sampel dengan waktu retensi untuk baku kafein dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 1. Waktu retensi sampel

Sampel	Replikasi	tR (menit)	ΔtR (tR baku- tR sampel)
1	1	1,212	0,014
	2	1,226	0,000
2	1	1,208	0,018
	2	1,207	0,019
3	1	1,234	0,008
	2	1,187	0,039
4	1	1,189	0,037
	2	1,227	0,001
5	1	1,231	0,005
	2	1,201	0,025
6	1	1,211	0,015
	2	1,205	0,021
7	1	1,224	0,002
	2	1,201	0,025
8	1	1,230	0,004
	2	1,203	0,023
9	1	1,202	0,024
	2	1,201	0,025
10	1	1,197	0,029
	2	1,184	0,042
11	1	1,223	0,003
	2	1,223	0,003
12	1	1,218	0,008
	2	1,219	0,007
13	1	1,232	0,006
	2	1,225	0,001

Berdasarkan data hasil analisis kualitatif yang diperoleh, pada baku kafein dan sampel yang dianalisis menunjukkan bahwa puncak yang muncul memiliki waktu rentensi yang hampir sama. Pada baku kafein menunjukkan adanya puncak pada waktu retensi ke-1,226 menit. Selisih tertinggi waktu retensi antara sampel yang dianalisis dengan waktu retensi baku kafein adalah 0,042 menit dan rata-rata selisih waktu retensi antara sampel yang dianalisis dengan waktu retensi baku kafein adalah 0,015 menit. Variasi waktu retensi yang diperbolehkan adalah $\leq 0,05$ menit (Synder, 2010). Oleh karena itu,

variasi waktu retensi pada penelitian ini dapat diterima dan dapat dipastikan dalam sampel yang analisis tersebut memiliki kandungan senyawa kafein.

Kurva baku kafein

Pada penelitian ini dilakukan pembuatan kurva baku kafein dengan menghubungkan antara konsentrasi baku kafein yang dianalisis dengan nilai AUC yang dihasilkan agar diperoleh suatu persamaan regresi linear yang akan digunakan untuk melakukan perhitungan kadar kafein pada masing-masing sampel yang dianalisis. Semakin linear suatu kurva baku maka semakin baik kurva baku yang dihasilkan. Parameter linearitas kurva baku yang baik ditentukan dengan nilai koefisien korelasi (R) yang diperoleh yaitu $\geq 0,99$ (AOAC, 2013).

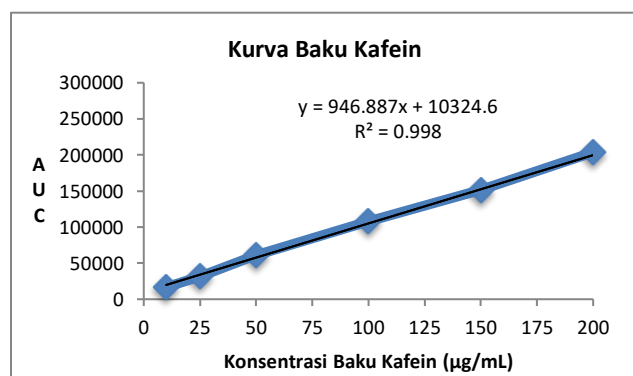
Larutan seri konsentrasi baku yang digunakan adalah konsentrasi 10, 25, 50, 100, 150, 200 dan 250 $\mu\text{g/mL}$ yang dibaca pada kecepatan alir 2,0 mL/menit dan volume injeksi 20 μL dengan menggunakan detektor UV 274 nm pada sistem HPLC selama 3 menit.

Dari hasil pembacaan larutan seri konsentrasi baku kafein ini didapatkan nilai AUC masing-masing larutan seri konsentrasi yang akan digunakan untuk mendapatkan persamaan regresi linear. Persamaan regresi linear didapatkan dengan menghubungkan antara seri konsentrasi larutan baku dengan nilai AUC masing-masing larutan seri konsentrasi baku yang dihasilkan. Hubungan konsentrasi kafein vs AUC tersebut dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2. Data Kurva Baku Kafein

Konsentrasi baku kafein µg/mL	AUC
10	16678
25	31780
50	61304
100	108061
150	151105
200	203455
250	243196
a = 10324,6	
b = 946,887	
R = 0,9992498, R ² = 0,9985001	

Berdasarkan data kurva baku kafein tersebut, hasil menunjukkan bahwa nilai koefisien korelasi yang diperoleh adalah 0,9992498. Nilai ini sesuai dengan parameter linearitas yang baik yaitu $\geq 0,99$ (AOAC, 2013). Pada penelitian ini diperoleh persamaan regresi linear $y = 946,887x + 10324,6$. Kurva hubungan antara seri konsentrasi larutan baku kafein dengan AUC masing-masing seri konsentrasi larutan baku kafein dapat dilihat pada gambar berikut.

**Gambar 5.** Kurva Hubungan Konsentrasi Baku Kafein vs AUC

Analisis kuantitatif

Jumlah sampel yang dianalisis sebanyak 13 sampel dan dilakukan replikasi sebanyak 2 kali untuk masing-masing sampel. Sampel yang diinjeksikan kedalam sistem HPLC adalah kristal kafein yang sudah dilarutkan dalam pelarut. Tujuan menggunakan kristal kafein ini adalah agar diperoleh bentuk kromatogram yang baik. Hasil kromatogram yang dihasilkan adalah berbentuk satu puncak kromatogram. Hasil kromatogram dikatakan memenuhi syarat kromatogram yang baik apabila puncak-puncak kromatogram yang dihasilkan sudah terpisah dan memiliki bentuk yang simetris. Kristal kafein yang dihasilkan adalah berbentuk serbuk

mengkilat seperti jarum berwarna putih sedikit kekuningan. Pemerian kafein dalam Farmakope Indonesia Edisi III adalah serbuk atau hablur bentuk jarum mengkilat, biasanya menggumpal, putih, tidak berbau dan rasa pahit.

Sebelum sampel diinjeksikan, terlebih dahulu sampel disaring menggunakan syringe filter 0,45µm yang telah dihubungkan dengan spuit 1 mL agar ukuran partikel homogen dan tidak ada zat asing pengotor yang ikut teranalisis. Sampel yang telah disaring ditampung dalam vial yang sebelumnya sudah di sonikasi. Tujuan sonikasi ini adalah untuk menghilangkan zat asing pengotor yang masih tertinggal dalam sampel dan menghilangkan udara atau gas dalam vial yang dapat berinteraksi dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor yang dapat berpengaruh terhadap hasil analisis yang diperoleh.

Analisis kuantitatif dilakukan dengan cara menghitung kadar kafein yang terdapat pada sampel produk bubuk kopi murni. Perhitungan kadar kafein ini berdasarkan persamaan regresi linier dari kurva baku yang diperoleh. Hasil analisis kadar kafein dalam sampel dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 3. Analisis Kadar Kafein dalam Sampel

Sampel	Replikasi	Kafein						
		Konsentrasi (µg/mL)	Kadar % (b/b)	1x penyajian @ 2g kopi (mg)	Rata-rata 1x penyajian (mg)	Rata-rata 1hari (4x penyajian) (mg)	SD	CV
1	1	84.49	0.634	12.674	12.987	51.948	0.443	3.41%
	2	88.67	0.665	13.301				
2	1	225.08	1.688	33.762	34.035	136.14	0.386	1.13%
	2	228.72	1.715	34.308				
3	1	22.44	0.168	3.366	3.755	15.018	0.549	14.63%
	2	27.62	0.207	4.143				
4	1	91.79	0.688	13.769	13.738	54.951	0.043	0.32%
	2	91.38	0.685	13.707				
5	1	117.21	0.879	17.582	17.729	70.917	0.209	1.18%
	2	119.18	0.894	17.877				
6	1	205.11	1.538	30.767	30.433	121.731	0.472	1.55%
	2	200.66	1.505	30.099				
7	1	188.11	1.411	28.217	27.565	110.259	0.922	3.34%
	2	179.42	1.346	26.913				
8	1	106.24	0.797	15.936	15.743	62.973	0.273	1.73%
	2	103.67	0.778	15.551				
9	1	135.52	1.016	20.328	19.855	79.419	0.669	3.37%
	2	129.21	0.969	19.382				
10	1	51.45	0.386	7.718	7.758	31.032	0.057	0.74%
	2	51.99	0.390	7.799				
11	1	60.65	0.455	9.098	9.191	36.762	0.132	1.43%
	2	61.89	0.464	9.284				
12	1	39.95	0.300	5.993	5.935	23.739	0.082	1.38%
	2	39.18	0.294	5.877				
13	1	68.50	0.514	10.275	10.532	42.129	0.364	3.45%
	2	71.93	0.539	10.790				

Secara keseluruhan, berdasarkan data kadar kafein dari sampel yang dianalisis diperoleh kadar kafein tertinggi terdapat pada sampel 2. Kadar kafein tersebut masih diterima karena kadar tidak melebihi batas yang diizinkan. Berdasarkan FDA (*Food and Drug Administration*), dosis kafein yang diizinkan adalah 100-200 mg/hari dan menurut SNI 01-7152-2006 batas maksimal dosis kafein pada makanan dan minuman ialah 150 mg/hari dan 50 mg/sajian (Maramis, dkk., 2013). Sedangkan kadar kafein terendah terdapat pada sampel 3. Kadar kafein yang terdapat pada kopi yang beredar di Kabupaten Pekalongan memiliki kadar kafein yang bervariasi, apabila terdapat kopi yang mengandung kadar kafein yang tinggi maka perlu dilakukan dekafeinasi guna menekan aktivitas kafein di dalam tubuh (Sofiana, 2011). Namun, dari hasil penelitian terhadap 13 sampel yang diperoleh tidak terdapat sampel kopi yang memiliki kandungan kadar kafein melebihi batas yang telah ditetapkan oleh SNI.

Variasi kadar kafein yang terkandung dalam produk bubuk kopi murni yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan disebabkan karena sampel kopi yang didapatkan untuk dianalisis berasal dari lebih dari satu tempat tumbuh.

Perbedaan letak geografis tempat tumbuh tanaman dapat berpengaruh terhadap senyawa yang terkandung pada tanaman karena perbedaan proporsi unsur hara yang terdapat dalam tanah tempat tumbuh tanaman (Farida, dkk., 2013). Selain itu, jenis kopi juga dapat berpengaruh terhadap kadar kafein yang terkandung. Kopi jenis arabika memiliki kadar kafein yang lebih rendah dibandingkan dengan kopi jenis robusta (Rahardjo, 2012). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang diperoleh, bahwa pada sampel kopi arabika memiliki kadar kafein yang lebih rendah dibandingkan dengan kopi robusta.

Faktor penyangrain juga sangat berpengaruh terhadap mutu kopi yang dihasilkan. Rusaknya mutu dapat berpengaruh terhadap kadar kafein yang terkandung dalam kopi. Dalam penelitian Fajriana (2018) menyatakan bahwa semakin tinggi temperatur sangrai terhadap biji kopi maka akan semakin rendah kadar kafeinnya. Hal ini dikarenakan proses penyangraian terhadap biji kopi dapat menyebabkan menguapnya kadar kafein dan akan terbentuk komponen lain seperti aldehida, keton, fulfural, ester, alkohol, asam asetat dan asam format. Temperatur dan waktu penyeduhan terhadap kopi dapat mempengaruhi

nilai kadar kafeinnya. Temperatur optimum untuk penyeduhan kopi adalah 90°C dan 100°C (Sabarni, 2018). Menurut *National Coffee Association*, temperatur ideal untuk membuat kopi adalah 90°C - 96°C. Apabila temperatur untuk penyeduhan kopi terlalu panas maka dapat berisiko kopi terlalu pahit. Sedangkan apabila temperatur untuk penyeduhan kopi terlalu dingin maka dapat berisiko kopi terasa asam. Semakin lama kopi didiamkan setelah penyeduhan, maka akan semakin banyak kandungan asam yang dikeluarkan (Blumberg, dkk., 2010).

Berdasarkan data kadar kafein yang diperoleh, dalam satu sampel menghasilkan kadar kafein yang berbeda-beda tiap replikasinya. Namun berdasarkan nilai CV masing-masing sampel yang dihasilkan, tidak terdapat nilai CV yang melebihi 15%. Kriteria penerimaan nilai CV adalah <15% yang terbagi berdasarkan konsentrasi (AOAC, 2013). Hal tersebut menunjukkan bahwa hasil kadar kafein yang didapatkan masih dapat diterima.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa kadar kafein pada produk bubuk kopi murni yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan dalam satu kali penyajian atau tiap 2 gram kopi (2 sdt) dan dalam sehari atau empat kali penyajian secara berturut-turut pada sampel 1 adalah 12,987 mg dan 51,984 mg; sampel 2 adalah 34,035 mg dan 136,4 mg; sampel 3 adalah 3,775 mg dan 15,018 mg; sampel 4 adalah 13,738 mg dan 54,951 mg; sampel 5 adalah 17,729 mg dan 70,917 mg; sampel 6 adalah 30,433 mg dan 121,731 mg; sampel 7 adalah 27,565 mg dan 110,259 mg; sampel 8 adalah 15,743 mg dan 62,973 mg; sampel 9 adalah 19,855 mg dan 79,419 mg; sampel 10 adalah 7,758 mg dan 31,032 mg; sampel 11 adalah 9,191 mg dan 36,762 mg; sampel 12 adalah 5,935 mg dan 23,739 mg serta sampel 13 adalah 10,532 mg dan 42,129 mg.

SARAN

Disarankan bagi masyarakat agar dapat lebih bijak dalam mengonsumsi kopi setelah mengetahui kadar kafein yang terkandung dalam produk kopi. Penelitian yang dilakukan hanya menggunakan 13 sampel produk bubuk kopi murni yang dihasilkan di Kabupaten Pekalongan sehingga diharapkan agar dapat dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap produk bubuk kopi murni lainnya yang dihasilkan di Kabupaten

Pekalongan yang belum dilakukan analisis kadar kafeinnya serta pengaruh temperatur dan lama waktu penyangraian biji kopi terhadap kadar kafein yang diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. (2013). Guideline for dietary supplements and botanicals. *Association Of Official Analytical Chemist*.
- Badan Standardisasi Nasional. (2006). *Bahan Tambahan Pangan-Persyaratan Perisa dan Penggunaan dalam Produk Pangan SNI-01-7152-2006*. Jakarta : Badan Standardisasi Nasional.
- Blumberg, S., Frank, O., dan Hofmann, T. (2010). Quantitative studies on the influence of the bean roasting parameters and hot water percolation on the concentrations of bitter compounds in coffee brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., 58 (6). 3720–3728.
- Chrismaaji, Y.D. (2018). Penetapan Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk Murni Robusta Merek X dengan Metode High Performace Liquid Chromatography (HPLC) Fase Terbalik. *Skripsi*. Yogyakarta : Universitas Sanata Dharma.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Edisi I*. Jakarta : Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Fajriana, N.H. dan Imelda, F. (2018). Analisis Kadar Kafein Kopi Arabika (*Coffea Arabica* L.) pada Variasi Temperatur Sangrai secara Spektrofotometri Ultra Violet. *Analit : Analytical and Environmental Chemistry*., 3 (2). 148-162.
- Farida, A., Ristanti R., dan Kumoro A. (2013). Penurunan kadar kafein dan asam total pada biji kopi robusta menggunakan farmasi anaerob fakultatif dengan mikroba noprok Mz-15. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*., 2 (1). 30-37.
- Fatoni, A. (2015). Analisa secara Kualitatif dan Kuantitatif Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk Lokal yang Beredar di Kota Palembang menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. *Laporan Penelitian Mandiri, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat*.

Palembang : Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Bhakti Pertiwi.

Gopala, J. (2016). Pengaruh Kecepatan Sentrifugasi terhadap Hasil Pemeriksaan Sedimen Urin Pagi Metode Konvensional. *Skripsi*. Semarang : Universitas Muhammadiyah Semarang.

Harmita, (2015). *Analisis Fisikokimia Potensiometri dan Spektroskopi*. Jakarta : Penerbit EGC.

Maramis, R.K., Citraningtyas, G. dan Wehantouw, F. (2013). Analisis Kafein dalam Kopi Bubuk di Kota Manado menggunakan Spektrofotometri UV Vis. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi.*, 2(4), 122-128.

Moffat, dkk. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids And Postmortem Material Edisi IV*. London : Pharmaceutical Press.

Muchtadi, Tien R, dkk. (2010). *Ilmu Pengetahuan Pangan*. Bandung : AlfaBeta.

Najib, A. (2018). *Ekstraksi Senyawa Bahan Alam*. Yogyakarta : Penerbit Deepublish.

Nollet, L. M. L. dan F. Toldra. (2015). *Handbook of Food Analysis Edisi III – Volume I*. New York: CRC Press.

Nugroho, J.W.K.. J. Lumbanbatu dan Rahayu. S. (2009). Pengaruh Suhu dan Lama Penyangraian terhadap Sifat Fisik Mekanis Biji Kopi Robusta. *Seminar Nasional dan Gelar Teknologi Faperta*. Yogyakarta : Universitas Gajah Mada

Rahardjo, P.(2012). *KOPI*. Jakarta : Penebar Swadaya.

Roosenda, K. dan Sunarti. (2016). Efektivitas Pelarut pada Ekstraksi dan Penentuan Kafein dalam Minuman Ringan Khas Daerah menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Kimia*. Yogyakarta : Universitas Negeri Yogyakarta

Sabarni dan Nurhayati. (2018). Analisis Kadar Kafein dalam Minuman Kopi Khop Aceh dengan Metode Spektroskopik. *Lentanida Journal.*, 6 (2), 141-155.

Sofiana, N. (2011). *Fakta Tentang Kopi*. Yogyakarta : Cahaya Atma Pustaka.

Synder, L.R, dan J.J Kirkland. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatograph Edisi IV*. New York : John Wiley & Sons.

Weinberg, B.A. dan Bonnie, K.B.(2010). *The Miracle of Caffeine : Manfaat Tak*

Terduga Kafein Berdasarkan Penelitian Paling Mutakhir. Bandung : Qanita

Yuwono, S.S. dan Elok W. (2017). *Teknologi Pangan Hasil Perkebunan*. Malang: UB Press