

**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR KAFEIN DALAM BUBUK KOPI VARIETAS ROBUSTA DAN ARABICA DI KECAMATAN PETUNGKRIYONO MENGGUNAKAN METODE *HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC) FASE TERBALIK**

**Muhammad Iqbal, Slamet dan Milatun Khanifah**  
**Fakultas Ilmu Kesehatan**  
**Universitas Muhammadiyah Pekajangan Pekalongan**  
Jl. Raya Ambokembang No. 8 Pekajangan – Pekalongan 51172  
Email : imgumelar9@gmail.com

**ABSTRAK**

Kopi banyak disukai masyarakat dibandingkan minuman jenis lain karena rasanya yang khas. Salah satu kandungan senyawa dalam kopi adalah kafein. Konsumsi berlebihan kafein dapat menyebabkan efek negatif sehingga BPOM mengatur batas konsumsi kafein yaitu 150 mg per hari sehingga perlu dilakukan penetapan kadar kafein dalam kopi terutama pada bubuk kopi di Kecamatan Petungkriyono. Suatu metode analisis seperti penetapan kadar senyawa harus divalidasi terlebih dahulu supaya metode analisis dapat dipertanggungjawabkan dan menjamin metode tersebut memberikan hasil maksimal. Dalam penelitian ini digunakan HPLC fase terbalik dengan fase gerak yaitu aquabidestilata dan metanol (50:50), fase diam kolom oktadesil silica C18, volume injeksi 20 µL, kecepatan alir 1,0 mL/menit, panjang gelombang pengamatan 273 nm, dan pada kondisi isokratik. Hasil yang didapatkan yaitu metode penetapan memenuhi kriteria parameter validasi meliputi selektivitas 2,215 (*R<sub>s</sub>* kopi robusta) dan 2,188 (*R<sub>s</sub>* kopi arabica); spesifitas (0.0497 menit); linieritas ( $r = 0.9953$ ); akurasi dan presisi pada konsentrasi 75, 150 dan 200 ppm; rentang pengukuran pada konsentrasi 25-300 ppm; LOD sebesar 10.7739 µg/mL dan LOQ sebesar 35.9131 µg/mL

Kata Kunci : *Kopi, kafein, HPLC fase terbalik, validasi metode*

**ABSTRACT**

Coffee is widely liked by people compared to other types of drinks because of its distinctive taste. One of the compounds in coffee is caffeine. Excessive consumption of caffeine can cause negative effects so that BPOM regulates the limit of caffeine consumption which is 150 mg per day so it is necessary to determine caffeine levels in coffee, especially in coffee powder in Petungkriyono District. An analytical method such as determining the content of the compound must be validated first so that the analytical method can be accounted for and ensure that the method provides maximum results. In this study the reverse phase HPLC was used with the mobile phase of aquabidestilata and methanol (50:50), the stationary phase of octadecyl silica C18 column, an injection volume of 20 µL, the flow velocity of 1.0 mL/minute, observation wavelength 273 nm, and under isocratic conditions. The results obtained were the determination method fulfilling the criteria for validation parameters including selectivity 2,215 (*R<sub>s</sub>* robusta) and 2,188 (*R<sub>s</sub>* arabica); specificity (0.0497 minutes); linearity ( $r = 0.9953$ ); accuracy and precision at concentrations of 75, 150 and 200 ppm; range at a concentration of 25-300 ppm; LOD 10.7739 µg/mL and LOQ 35.9131 µg/mL.

Keywords : *Coffee, caffeine, reverse phase HPLC, method validation*

## PENDAHULUAN

Menurut Mitchell *et. al.*, pada tahun 2014 minuman-minuman yang mengandung kafein menjadi konsumsi lebih dari 50% masyarakat di Indonesia dan 85% masyarakat di Amerika. Di asia, konsumsi kopi mencapai 13,8% pada tahun 2012 dari total konsumsi kopi dunia (*International Coffe Organization*, 2014). Data *National Coffe Assosiated United States* juga menunjukkan bahwa pada tahun 2011 terdapat peningkatan konsumsi kopi per hari pada remaja usia 18-24 tahun. Bahkan konsumsi kopi meningkat 98% dalam sepuluh tahun terakhir di Indonesia (Ingrouille, 2013).

Salah satu kandungan senyawa dalam kopi adalah kafein yang merupakan senyawa berbentuk kristal dengan senyawa penyusun utamanya adalah senyawa turunan protein yang disebut dengan *purin xantin* (Isnindar dkk, 2016). Konsumsi kafein yang berlebihan dapat menyebabkan gelisah, gugup, insomnia, hipertensi, bahkan infark myocard (Chambers, 2009). Sehingga untuk mengurangi dampak yang tidak diinginkan *Food Drugs Administration* (FDA) mengatur dosis konsumsi kafein dalam makanan atau minuman yang diizinkan yaitu 100-200 mg per hari (Liska, 2004). Sementara dalam surat keputusan Kepala Badan Pengawasan Obat Dan Makanan Republik Indonesia nomor HK.00.05.23.3644 tentang ketentuan pokok pengawasan suplemen makanan tahun 2004 tertulis bahwa konsumsi maksimal makanan atau minuman yang mengandung kafein adalah 150 mg per hari dibagi dalam tiga dosis.

Berdasarkan review yang dilakukan Patil (2012), dikatakan bahwa berbagai jenis sampel yang apabila mengandung kafein seperti teh, kopi, formulasi farmasi dan minuman berenergi dapat dianalisis menggunakan HPLC fase terbalik. HPLC fase terbalik juga lebih dianjurkan digunakan untuk menganalisis sampel yang bersifat basa dan kationik (Harmita, 2009). Sementara itu suatu metode

analisis seperti penetapan kadar senyawa harus divalidasi terlebih dahulu untuk memastikan bahwa parameter kerjanya mampu mengatasi masalah ketika analisis dilakukan (Gandjar dan Rohman, 2014). Alasan yang lain dilakukannya validasi metode analisis karena metode baku yang digunakan dilakukan di suatu laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analis yang berbeda atau dikerjakan dengan alat yang berbeda pula. Maka dari itu validasi metode menjadi hal yang penting dan harus lebih dulu dilakukan sebelum melakukan suatu metode analisis (Gandjar dan Rohman, 2014). Validasi metode dilakukan dengan menganalisis beberapa parameter yaitu selektivitas spesifitas, linieritas, akurasi, presisi, LOD, LOQ dan rentang.

Menurut penelitian Utama (2014), Kecamatan Petungkriyono merupakan salah satu kecamatan yang menghasilkan kopi. Kecamatan Petungkriyono juga merupakan salah satu kecamatan dengan pengelolaan kopi yang maju karena memiliki industri kecil menengah kopi. Data Dinas Perindustrian Perdagangan dan Koperasi Kabupaten Pekalongan terdapat total delapan produsen produk kopi yang ada di Kecamatan Petungkriyono, dari delapan produsen tersebut seluruhnya belum mencantumkan kandungan nutrisi dalam kemasan produk kopinya. Karena penelitian tentang analisis penetapan kadar kafein dalam kopi di Petungkriyono belum pernah dilakukan. Dari uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian tentang validasi metode penetapan kadar kafein bubuk kopi varietas robusta dan arabica di Kecamatan Petungkriyono dengan metode *High Performance Liquid Chromatography* fase terbalik.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel bubuk kopi varietas robusta dan arabica di Kecamatan

Petungkriyono, metanol, kloroform (Pro analis grade), aquabidestilata, baku kafein, natrium hidroksida, seng asetat, kalium ferisianida, etil asetat, metanol,  $\text{NH}_4\text{OH}$  pekat, pereaksi dragendorf dan pereaksi meyer.

#### **Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat HPLC Fase terbalik LC-2010C dengan detector UV, kolom C18 dimensi 250 x 4,6 mm dan ukuran pori 5  $\mu\text{m}$ , seperangkat computer, Printer, spektrofotometer UV-Vis, timbangan analitik, ultrasonikator, alat vakum, sentrifugator, Solvent Membrane Filter Whatman, spuit injeksi 5 mL, waterbath, corong Buchner, syringe filter ukuran pori 0,45  $\mu\text{m}$ , mikropipet 100  $\mu\text{L}$  dan 1000  $\mu\text{L}$ , mikrotube 2 mL, dan alat-alat gelas.

#### **Tempat Penelitian**

Tempat penelitian ini di Laboratorium Farmasi Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Pekajangan Pekalongan

#### **Cara Kerja**

##### **Preparasi Sampel**

Sampel bubuk kopi varietas robusta dan arabica di Kecamatan Petungkriyono ditimbang saksama sebanyak 2 g, dilarutkan dalam 150 mL akuades panas 90 derajat celsius lalu diaduk. Sejumlah 1 mL larutan kopi ditampung dalam mikrotube, tambahkan seng asetat 1,37 M dan kalium ferisianida 0,35 M masing-masing sebanyak 500  $\mu\text{L}$  lalu divortex. Koloid yang terbentuk kemudian disentrifugasi menggunakan sentrifugator kecepatan 5000 rpm selama 5 menit sampai filtrate terpisah. Filtrate yang diperoleh kemudian ditampung dalam suatu wadah. Filtrate yang diperoleh ditambah 40  $\mu\text{L}$   $\text{NaOH}$  10 N kemudian diekstraksi dengan 1 mL kloroform lalu divortex. Fase kloroform dilakukan tiga kali untuk masing-masing larutan seri baku kafein lalu diuapkan dengan waterbath suhu 90°C dalam lemari asam hingga didapat ekstrak kering kafein. Ekstrak kering kafein

tersebut dilarutkan dengan 1 mL pelarut. saring menggunakan syringe filter ukuran pori 0,45  $\mu\text{m}$  lalu diawaudarakan menggunakan ultrasonikator selama 5 menit. Direplikasi tiga kali (Yulius, 2018).

##### **Uji Fitokimia Alkaloid**

Sampel bubuk kopi varietas robusta dan arabica di Kecamatan Petungkriyono ditimbang saksama sebanyak 2 g, dilarutkan dalam 150 mL akuades panas 90 derajat celsius lalu diaduk. Sejumlah 2 mL larutan kopi dimasukkan dalam tabung reaksi. Tambahkan 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N kemudian bagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes pereaksi dragendorf, tabung II ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Wagner. Hasil positif mengandung alkaloid apabila terbentuk endapan warna merah bata, merah, jingga (dengan pereaksi dragendorf) dan endapan merah (dengan pereaksi Wagner) menunjukkan adanya kandungan alkaloid (Rizky, 2014).

##### **Uji Kromatografi Lapis Tipis**

Sampel yang sudah dipreparasi ditotolkan bersama baku kafein dengan jarak totolan satu cm pada lempeng KLT. Masukkan fase diam (lempeng KLT) kedalam chamber yang telah dijenuhkan. Tunggu lempeng KLT hingga eluen bergerak melewati batas. Ambil lempeng KLT, diamati di bawah lampu UV 254 nm kemudian hitung nilai Rfnya. Fase gerak adalah etil asetat: metanol :  $\text{NH}_4\text{OH}$  pekat (85:10:5) dan fase diamnya adalah lempeng KLT GF 254 (Dewi dkk, 2017).

##### **Pembuatan Fase gerak dan pelarut**

Pelarut yang digunakan adalah metanol dan aquabidestilata dengan perbandingan 50:50. Larutan disaring menggunakan kertas saring whatman pada corong Buchner dengan dibantu pompa vakum, kemudian diawaudarakan menggunakan ultrasonikator selama 5 menit (Kurniawan, 2017).

***Pembuatan Larutan Stok dan larutan seri baku kafein***

Baku kafein ditimbang dengan saksama 100 mg selanjutnya dilarutkan dengan pelarut dalam labu takar 50 mL sehingga didapat konsentrasi larutan stok 2000 ppm. Sejumlah 5,0 mL larutan stok kafein dilarutkan dengan pelarut dalam labu takar 10 mL sehingga konsentrasi larutan intermediet kafein menjadi 1000 ppm (Maria, 2018). Larutan seri kafein dibuat dengan cara mengambil masing-masing 75, 100, 125, 150, 175, dan 200  $\mu$ L dari larutan intermediet kafein. Masukkan kedalam mikrotube kemudian ditambahkan sejumlah pelarut sampai masing-masing seri volumenya 1 mL sehingga larutan seri baku kafein dengan konsentrasi 75, 100, 125, 150, 175 dan 200 ppm. Masing-masing larutan seri baku kafein ditambah 40  $\mu$ L NaOH 10 N kemudian diekstraksi dengan 1 mL kloroform lalu divortex. Fase kloroform dilakukan tiga kali untuk masing-masing larutan seri baku kafein lalu diuapkan dengan waterbath suhu 90°C dalam lemari asam hingga didapat ekstrak kering kafein. Ekstrak kering kafein tersebut dilarutkan dengan 1 mL pelarut. saring menggunakan syringe filter ukuran pori 0,45  $\mu$ m lalu diawaudarkan menggunakan ultrasonikator selama 5 menit. Direplikasi tiga kali (Maria, 2018).

***Penentuan panjang gelombang serapan maksimum kafein***

Larutan seri kafein untuk penetapan panjang gelombang serapan maksimum dibuat dengan cara mengambil sebanyak 125, 150 dan 250  $\mu$ L larutan intermediet kafein, ditambahkan pelarut dalam labu takar 5 mL. Masing-masing larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 225-325 nm menggunakan spektrofotometer UV (Yulius, 2018). Panjang gelombang maksimum dipilih dari seri konsentrasi yang memberikan nilai absorbansi paling tinggi, kemudian digunakan untuk mendeteksi kafein pada sistem HPLC (Maria, 2018).

***Penentuan persen perolehan kembali***

Sampel bubuk kopi yang telah dilarutkan ditambahkan sejumlah 1 mL larutan kopi ditampung dalam mikrotube, tambahkan sejumlah 75  $\mu$ L baku kafein. Tambahkan pereaksi dan perlakuan seperti pada preparasi sampel (Yulius, 2018).

***Penentuan selektifitas dan spesifitas***

Ukur nilai AUC 1 ml larutan sampel kopi dan 75  $\mu$ L baku kafein seperti pada penentuan persen perolehan kembali. Selektivitas spesifitas ditentukan dengan mengamati resolusi dari kromatogram kafein pada sampel kopi dengan nilai  $\geq 1,5$ . Spesifitas ditentukan dengan mengamati kromatogram dan waktu retensi kafein pada larutan baku, sampel kopi tanpa adisi baku, dan sampel kopi dengan adisi baku kafein  $\leq 0,05$  menit (Maria, 2018).

***Penentuan kurva baku dan linieritas***

Ukur nilai AUC larutan seri baku kafein. Dari kromatogram akan diperoleh nilai AUC untuk masing-masing seri konsentrasi. Nilai AUC kemudian diplotkan terhadap masing-masing seri konsentrasi baku kafein untuk memperoleh persamaan  $y=bx+a$ . linieritas ditentukan dari nilai koefisien relasi ( $r$ )  $> 0,99$  (Maria, 2018).

***Penentuan akurasi dan presisi***

Larutan seri kafein dibuat dengan cara mengambil sebanyak 75, 150, dan 200  $\mu$ L larutan intermediet kafein dalam mikrotube, lalu ditambah pelarut sampai seri volumenya menjadi 1 mL sehingga didapat larutan seri baku kafein dengan konsentrasi 75, 150, 200 ppm. Masing-masing larutan seri baku kafein ditambah 40  $\mu$ L NaOH 10 N kemudian diekstraksi dengan 1 mL kloroform lalu divortex. Lanjutkan perlakuan seperti pada preparasi sampel. Nilai akurasi ditentukan dengan membandingkan hasil kadar analit uji dengan kadar standar analit untuk masing-masing seri konsentrasi dengan nilai batas 85%-110% pada konsentrasi 100 ppm dan 90%-108%

pada konsentrasi 1000 ppm. Nilai presisi ditentukan dengan membandingkan hasil standar deviasi dengan rata-rata jumlah akurasi dengan nilai batas 4% pada konsentrasi 100 ppm dan 3% pada konsentrasi 1000 ppm (Maria, 2018).

#### **Penentuan LOQ dan LOD**

Nilai AUC larutan seri baku kafein pada kurva kalibrasi didapatkan nilai simpangan deviasi dan persamaan garis lurus ( $y=bx+a$ ) dari konsentrasi tersebut terhadap area dari berbagai kadar dengan menentukan dengan standar deviasi dari respon dengan rumus  $LOD=3(SD/S)$  dan  $LOQ=10(SD/S)$  dimana SD merupakan standar deviasi residual ( $Sy/x$ ), sedangkan S adalah slope dari kurva kalibrasi (Ahuja dan Dong, 2005).

#### **Penentuan rentang**

Larutan seri kafein diambil sebanyak 25, 50, 225, 250, 275 dan 300  $\mu$ L dari larutan intermediet kafein dalam mikrotube. Tambahkan sejumlah pelarut sampai masing-masing seri volumenya menjadi 1 mL sehingga didapat larutan seri baku kafein dengan konsentrasi 25, 50, 225, 250, 275 dan 300 ppm. Masing-masing larutan seri baku kafein ditambah 40  $\mu$ L NaOH 10 N kemudian diekstraksi dengan 1 mL kloroform lalu divortex. Lanjutkan perlakuan seperti pada preparasi sampel. Rentang pengukuran ditentukan dari konsentrasi terendah dan tertinggi seri baku kafein yang masih memenuhi parameter linieritas, akurasi dan presisi dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ )  $>0,99$  (Maria, 2018).

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Preparasi Sampel**

Preparasi sampel adalah prosedur pembersihan (Clean up) berbagai matriks yang ada pada sampel kopi dari senyawa – senyawa lain yang dapat mengganggu analisis. Sampel bubuk kopi harus dipreparasi terlebih dahulu untuk menghilangkan molekul – molekul besar

seperti tannin, protein dan lemak yang dapat menyumbat kolom dan dapat mengganggu analisis kuantitatif (Nollet dan Toldra, 2015).

Seng asetat dan kalium ferisianida adalah pereaksi yang digunakan untuk proses pembersihan (clean up) molekul – molekul lain pada sampel bubuk kopi sehingga membentuk pereaksi seng ferisianida yang dapat mengendapkan protein, asam amino, tannin, lemak dan zat warna pada larutan sampel bubuk kopi sehingga membentuk koloid. Koloid dipisahkan menggunakan setrifugator selama lima menit pada kecepatan 5000 rpm sehingga didapatkan filtrat berwarna kuning dan endapan putih kecoklatan.

Filtrat yang diambil kemudian ditambahkan larutan NaOH 10 N. Penambahan NaOH digunakan untuk mengubah kafein pada larutan kopi yang mempunyai bentuk garam larut dalam air menjadi bentuk basa larut dalam kloroform (Yulius, 2017). kemudian diekstraksi menggunakan kloroform 1 mL sebanyak tiga kali. Kloroform memiliki titik didih yang rendah yaitu 61-62 oC sehingga mudah menguap dengan pemanasan sedang (Moffat et, al., 2011). Pada tahap ini, senyawa polar akan terlarut dalam aquabidestilata dan senyawa non polar terutama kafein dalam bentuk basanya akan terlarut dalam kloroform.

Larutan tersebut kemudian dipanaskan dalam waterbath dengan suhu 90 oC sampai didapatkan kristal kafein. Kristal yang terbentuk kemudian dilarutkan dalam 1 mL pelarut, saring dengan microfilter 45  $\mu$ m untuk menyaring pengotor yang ada sebelum disuntikan ke instrumen HPLC.

#### **Skrining Fitokimia Alkaloid**

skrining fitokimia yang dilakukan adalah uji alkaloid karena kafein merupakan senyawa alkaloid yang termasuk jenis metilxantin (1,3,7-trimethylxantin) (Farida dkk, 2013). Berdasarkan hasil yang didapatkan bubuk kopi robusta dan arabica di Kecamatan Petungkriyono positif mengandung alkaloid.

Tabel 1. Data hasil skrining fitokimia alkaloid

| Pereaksi   | Hasil   |         |
|------------|---------|---------|
|            | Robusta | Arabica |
| Dragendorf | +       | +       |
| Wagner     | +       | +       |

### Uji Kualitatif KLT

Pada penelitian ini digunakan fase diam silika gel F254, fase gerak etil asetat: metanol : NH<sub>4</sub>OH pekat (85:10:5), dilakukan penjujukan pada chamber dan diamati pada sinar UV 254 nm. Didapatkan hasil jarak pada baku kafein, kopi robusta dan kopi arabica masing-masing 4 cm dan nilai R<sub>f</sub> masing-masing 0,47.



Gambar 1. Penampakan dan pengukuran bercak. (a) baku kafein, (b) sampel kopi robusta dan (c) sampel kopi arabica pada fase diam silika gel F254 pada detektor sinar UV 254 nm dengan fase gerak etil asetat: metanol : NH<sub>4</sub>OH pekat (85:10:5).

### Penentuan panjang gelombang maksimal

Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan karena menurut Gadjar dan Rohman (2014) panjang gelombang maksimal memiliki kepekaan maksimal saat pengukuran sehingga dapat mengukur perubahan absorbansi untuk tiap satuan konsentrasi pada nilai yang paling besar.



Gambar 2. Struktur kafein dengan gugus auksokrom dan kromofor (Clara, 2017)

Kafein memiliki gugus auksokrom dan gugus kromofor pada struktur kimianya (Gambar 2) sehingga mampu memberikan nilai serapan pada daerah sinar ultraviolet (Clara, 2017).

Tabel 2. Data panjang gelombang maksimal

| Kadar  | Konsentrasi Ppm | Panjang Gelombang | Absorbansi |
|--------|-----------------|-------------------|------------|
| 125 µL | 25              | 273               | 1.494      |
| 150 µL | 30              | 272.9             | 1.874      |
| 250 µL | 50              | 273               | 2.503      |

Pada penentuan panjang gelombang maksimal ini digunakan tiga konsentrasi larutan baku kafein yaitu 25, 30 dan 50 ppm dilakukan pada kisaran panjang gelombang 225-325 nm, karena kafein memiliki panjang gelombang pada rentang panjang gelombang tersebut yaitu 273

nm (Moffat et, al., 2011). Hasil panjang gelombang pada pengukuran yang didapat pada konsentrasi 25, 30 dan 50 ppm menunjukan bahwa panjang gelombang yang didapatkan menyamai panjang gelombang kafein sesuai dengan literatur yaitu 273 nm sehingga panjang

gelombang tersebut digunakan sebagai panjang gelombang maksimal pada pengukuran menggunakan instrumen HPLC.

### Validasi Metode

Validasi metode pada penetapan kadar kafein dalam bubuk kopi varietas robusta dan arabica di Kecamatan Petungkriyono dilakukan dengan metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) fase terbalik menggunakan fase gerak aquabidestilata : metanol (50:50), fase diam menggunakan oktadesil silika C18 dengan kecepatan alir 1

mL/menit. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 273 nm.

### Penentuan Selektivitas dan Spesifitas

Pada tabel 3 menunjukan nilai resolusi kafein pada sampel kopi robusta dan arabica di Kecamatan Petungkriyono yang diukur sebanyak tiga kali memiliki selektivitas yang baik memenuhi kriteria yaitu  $\geq 1,5$ . Nilai resolusi ini menjadi tanda bahwa metode yang digunakan dapat memisahkan analit (kafein) dari senyawa yang lain.

Tabel 3. Data nilai resolusi kafein pada sampel bubuk kopi

| Replikasi | Resolusi |         |
|-----------|----------|---------|
|           | Robusta  | Arabica |
| 1         | 2.244    | 2.167   |
| 2         | 2.205    | 2.197   |
| 3         | 2.198    | 2.202   |
| Rata-rata | 2.215    | 2.188   |

Pada Tabel 4 data nilai waktu retensi diketahui bahwa baku kafein 75  $\mu$ L, sampel robusta, sampel arabica, sampel adisi robusta dan sampel adisi arabica mempunyai nilai waktu retensi yang berdekatan dan memiliki selisih 0,0497 menit. Sementara syarat variasi waktu retensi yang diperbolehkan adalah  $\leq 0,05$  menit.

Variasi waktu retensi yang hampir sama menandakan bahwa sampel kopi baik robusta dan arabica memiliki kandungan kafein serta nilai tinggi puncak yang naik pada adisi baku pada sampel menunjukkan peningkatan nilai AUC sehingga mendukung pernyataan adanya kandungan kafein dalam sampel.

Tabel 4. Data nilai waktu retensi

| Konsentrasi            | Waktu Retensi |             |             |           |                 |
|------------------------|---------------|-------------|-------------|-----------|-----------------|
|                        | Replikasi 1   | Replikasi 2 | Replikasi 3 | Rata-rata | Selisih         |
| Baku Kafein 75 $\mu$ L | 2.411         | 2.419       | 2.425       | 2.418     | 0.0497<br>menit |
| Sampel Robusta         | 2.437         | 2.475       | 2.492       | 2.468     |                 |
| Sampel Adisi Robusta   | 2.465         | 2.437       | 2.417       | 2.440     |                 |
| Sampel Arabica         | 2.426         | 2.491       | 2.439       | 2.452     |                 |
| Sampel Adisi Arabica   | 2.489         | 2.408       | 2.427       | 2.441     |                 |

**Penentuan linieritas dan kurva baku**

Data dari ketiga replikasi yang didapatkan dipilih nilai koefisien korelasi ( $r$ ) yang paling bagus yaitu  $\geq 0,99$  atau mendekati 1. Nilai koefisien korelasi menunjukkan hubungan peningkatan konsentrasi dan respon instrumen

yang linier (AOAC, 2013). Replikasi 3 pada tabel 5 memiliki nilai koefisien korelasi yang paling bagus sehingga digunakan untuk menghitung kadar kafein dalam sampel kopi robusta dan arabica.

Tabel 5. Data nilai AUC dari larutan seri kafein

| Konsentrasi | AUC         |              |               |
|-------------|-------------|--------------|---------------|
|             | Replikasi I | Replikasi II | Replikasi III |
| 75          | 289236      | 271742       | 270187        |
| 100         | 379090      | 374860       | 390827        |
| 125         | 538377      | 523623       | 529029        |
| 150         | 588374      | 587078       | 619530        |
| 175         | 757394      | 760632       | 762048        |
| 200         | 880685      | 840251       | 842410        |
| b           | 4733.9      | 4643.8       | 4646.0        |
| a           | 78717.0     | 78823.0      | 69824.0       |
| r           | 0.9874      | 0.9901       | 0.9953        |

Keterangan : b = nilai sloph/koefisien regresi, a = nilai intersep,  
r = nilai regresi

**Penentuan akurasi presisi**

Menurut AOAC (2013) standar penerimaan nilai akurasi dan presisi pada konsentrasi 100 ppm adalah 85%-110% dan 4%, sedangkan pada konsentrasi 1000 ppm adalah 90%-108% dan 3%. Berdasarkan tabel 4.7 perolehan nilai pada konsentrasi bawah (75 ppm), tengah (150

ppm) dan atas (200 ppm) mempunyai nilai akurasi dan presisi dengan nilai berturut-turut yaitu  $100,63\% \pm 2,9978\%$ ;  $98,97\% \pm 1,5415\%$  dan  $99,49\% \pm 2,4453\%$ . Nilai akurasi dan presisi yang didapatkan dianggap baik karena memenuhi kriteria yang ditentukan.

Tabel 6. Data nilai akurasi dan presisi

| Level Kadar | Kadar teoritis (ppm) | Kadar terukur (ppm) | Nilai Akurasi (%) | Rata-rata akurasi (%) | SD     | KV             |
|-------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|--------|----------------|
| Bawah       | 75                   | 78.080              | 104.11            | 100.63                | 3.0168 | $\pm 2.9978\%$ |
|             |                      | 74.338              | 99.12             |                       |        |                |
|             |                      | 74.005              | 98.67             |                       |        |                |
| Tengah      | 150                  | 147.414             | 98.28             | 98.97                 | 1.5256 | $\pm 1.5415\%$ |
|             |                      | 146.880             | 97.92             |                       |        |                |
|             |                      | 151.084             | 100.72            |                       |        |                |
| Atas        | 200                  | 204.593             | 102.30            | 99.49                 | 2.4328 | $\pm 2.4453\%$ |
|             |                      | 195.944             | 97.97             |                       |        |                |
|             |                      | 196.406             | 98.20             |                       |        |                |

Berdasarkan Tabel 7 didapatkan rata-rata nilai persen perolehan kembali sampel kopi robusta dan arabica yaitu 104% dan 99%. Hasil ini memenuhi kriteria penerimaan yang diatur

oleh AOAC (2013) bahwa kriteria perolehan kembali pada kadar 100 ppm adalah tidak kurang dari 95%.

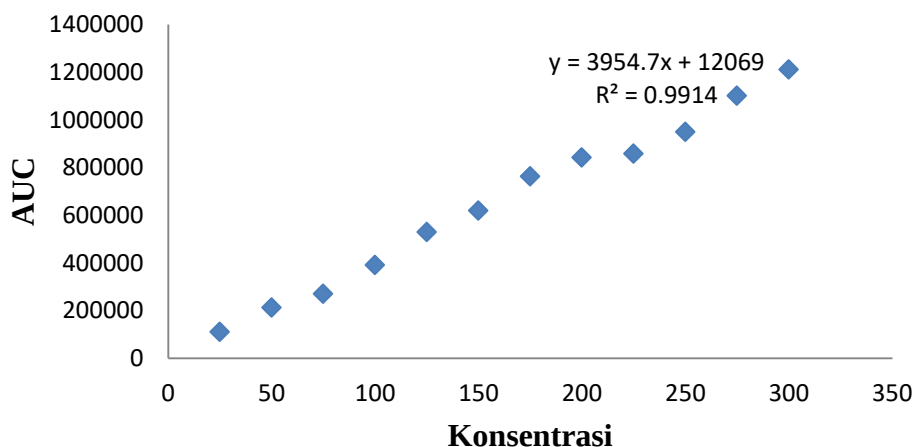
Tabel 7. Data persen perolehan kembali sampel adisi baku kafein

|         | Sampel | Sampel Adisi | Konsentrasi Adisi Baku Kafein (ppm) | Kadar teoritis (ppm) | Perolehan Kembali | Rata-rata |
|---------|--------|--------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------|-----------|
| Robusta | 49.103 | 127.337      | 78.234                              | 75                   | 104%              | 104%      |
|         | 46.743 | 126.260      | 79.517                              |                      | 106%              |           |
|         | 47.395 | 123.490      | 76.095                              |                      | 101%              |           |
| Arabica | 46.111 | 121.350      | 75.239                              | 75                   | 100%              | 99%       |
|         | 45.306 | 117.764      | 72.458                              |                      | 97%               |           |
|         | 45.702 | 119.722      | 74.020                              |                      | 99%               |           |

#### Penentuan rentang

Pada penelitian ini digunakan kisaran konsentrasi yaitu 25, 50, 225, 250, 275 dan 300

ppm dan didapatkan hasil persamaan  $y = 3954.7x + 12069$  dengan koefisien korelasi memenuhi kriteria yaitu  $r^2 = 0.9914$  (Gambar 3).



Gambar 3. Kurva rentang baku kafein

#### Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ)

Pada penelitian ini didapatkan nilai simpangan baku residual (SD) 16685.20967 dan

slope (b) 4646.0 sehingga nilai LOD dan LOQ yang didapatkan adalah 10.7739  $\mu\text{g/mL}$  dan 35.9131  $\mu\text{g/mL}$  (tabel 8).

Tabel 8. Data nilai LOD LOQ

| Parameter | Rumus                | Nilai ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-----------|----------------------|----------------------------|
| LOD       | $(3 \cdot S_y/x)/b$  | 10.7739                    |
| LOQ       | $(10 \cdot S_y/x)/b$ | 35.9131                    |

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa metode penetapan kadar kafein dalam bubuk kopi varietas robusta dan arabica di Kecamatan Petungkriyono dengan metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) fase terbalik menggunakan fase gerak aquabidestilata : metanol (50:50), fase diam oktadesil silika C18 dengan kecepatan alir 1 mL/menit dan panjang gelombang 273 nm mendapatkan hasil yaitu memenuhi kriteria parameter validasi meliputi selektivitas 2,215 (Rs kopi robusta) dan 2,188 (Rs kopi arabica); spesifitas (0.0497 menit); linieritas ( $r = 0.9953$ ); akurasi dan presisi pada konsentrasi 75, 150 dan 200 ppm; rentang pengukuran pada konsentrasi 25-300 ppm; LOD sebesar 10.7739  $\mu\text{g/mL}$  dan LOQ sebesar 35.9131  $\mu\text{g/mL}$ .

### Saran

Dari penelitian validasi metode ini, dapat dilakukan penelitian lebih lanjut yaitu penetapan kadar kafein dalam bubuk kopi varietas robusta dan arabica di Kecamatan Petungkriyono dengan metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) fase terbalik sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam pemanfaatan dan pengembangan budidaya tanaman kopi di Kecamatan Petungkriyono.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agung, S. (2017). Validasi Metode Bioanalisis Kafein Dalam Sampel Darah Orang Jawa Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fase Terbalik. *Skripsi*. Universitas Sanata Dharma.
- Ahuja, S., Dong, M. W. (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC First Edition*. United Kingdom : Elsevier Inc.
- Anthony C. Moffat. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 4th Edition* . USA : Pharmaceutical Press
- AOAC. (2013). *Guidline for Dietary Supplements and Botanicals*. Maryland, USA : Association of Official Analytical Chemist.
- Cazes, J Eds. (2004). *Encyclopedia of Chromatography*. New York : Marcel Decker Inc.
- Chambers, K. P. (2009). *Caffeine and Health Research*. New York : Nova Biomedical Books.
- Chowdbhury, S.R., Maleque, M. dan Shihan, M. (2012). Development And Validation Of A Simple RP-HPLC Method For Determination Of Caffeine In Pharmaceutical Dosage Forms. *Asian Pharma Press*, 1, 1-4
- 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.
- Christian, G. D. (2004). *Analytical Chemistry 6th Edition*. USA : Jhon wiley & Sons Inc.
- Clara, M. (2018). Validasi Metode High Performace Liquid Chromatography Fase Terbalik Pada Penetapan Kadar Kafein Dalam Kopi Bubuk Murni Robusta Merek X. *Skripsi*. Yogyakarta : Universitas Sanat Dharma.

- Dewi, NF., Fajaryanti N., Masruriati E. (2017). Perbedaan Kadar Kafein Pada Ekstrak Biji, Kulit Buah dan Daun Kopi (*Coffea Arabica* L) Dengan Metode Spektrofometri UV-Vis. *Jurnal Farmasetis*, 2, 29-38.
- Farida, A., Ristanti, E R., Kumoro, A C. (2013). Penurunan Kadar Kadein Dan Asam Total Pada Biji Kopi Robusta Menggunakan Teknologi Fermentasi Anaerob Fakultas Dengan Mikroba Nopkor Mz-15. *Jurnal Teknologi Kimia Dan Industri*, 2, 70-75.
- Gandjar, I G., Rohman, A. (2012). *Analisis Obat secara Spektrofotometri dan Kromatografi*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar
- Gandjar, I G., Rohman, A. (2014). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Harmita,. (2009). *Analisis Fisikokimia Kromatografi*. Jakarta : EGC.
- Harmita,. (2009). *Penetapan Kadar Bahan Baku Obat dan Sediaan Farmasi*. Jakarta : Kedokteran EGC
- Harmita,. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1. 117-135.
- Harvey R., Champe. CP. (2013). *Farmakologi Ulasan Bergambar Edisi 4*. Jakarta : EGC
- Ingrouille, K. (2013). Effect Caffeinated Beverages upon Breakfast Meal Consumption of University Wisconsin-Stout Undergraduate Student, *PP*. 1-12
- International Coffee Organization. (2014). Coffee Consumption in East and Southeast Asia : 1990-2012. *International Coffee Council 112<sup>th</sup> Session*, 4, 1-16
- Isnindar dkk. (2016). Analisis Kandungan Kafein Pada Ekstrak Buah Kopi Mentah Dari Perkebunan Merapi Daerah Istimewa Yoryakarta Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*, 5, 187-190.
- Kazakevich, Y., Lobrutto, R. (2007). *HPLC For Pharmaceutical Scientists*. Hoboken, New Jersey : John Wiley & Sons, Inc.
- Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia. (2004). *Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan*. Jakarta : Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia.
- Kurniawan, J. R., (2017). Optimasi Metode Bioanalisis Kafein dalam Sampel Darah Orang Jawa dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fase Terbalik. *Skripsi*. Yogyakarta : Universitas Sanata Dharma
- Koblova, P et, al,. (2012). Development and Validation of A Rapid HPLC Method for The Determination of Asorbic Acid, Phenylephrine, Caffeine and Paracetamol Using a Monolithic Column. *Analytical Method, The Royal Society Chemist*, 4, 1588-1591.
- Liska, K. 2004. *Drugs and The Body with Implication for Society Edisi ke-7*. New 1Jersey: Pearson
- Liveina., Artini, I. G. A., (2013). Pola Konsumsi Dan Efek Samping Minuman Mengandung Kafein Pada Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. *Liveina, PP*. 1-12
- Minarno, E Budi. (2015). Skrining Fitokimia dan Kandungan Total Flavonoid Pada Buah *Carica pubescens*& K. Koch Di Kawasan Bromo, Cangar, dan Dataran Tinggi Dieng. Fakultas Saintek Universitas Islam Negri

- Maulana Malik Ibrahim Malang. *Jurnal*, 5, 2, 73-82
- Mitchell, D. C., Knight, C. A., Hockenberry, J., Teplansky, R dan Hartman, T. J., (2014). Beverage Caffeine Intakes in The U.S. *Food and Chemical Toxicology, Elsevier Ltd*, 63, 136-142.
- Naveen P., HB Lingaraju., M Deepak., B Medhini., K Shyam Prasad. (2018). Method Development and Validation for the Determination of Caffeine : An Alkaloid from Coffea arabica by High-performance Liquid Chromatography Method. *Pharmacognosy Research*.10, 88-91.
- Nollet, Leo M. L., Toldrá, Fidel. (2015). *Handbook of food analysis. Volume I*. Boca Raton : CRC Press
- Oktadina, F. D dkk, (2013). Pemanfaatan Nanas (Ananas Comosus L. Merr) Untuk Penurunan Kadar Kafein Dan Perbaikan Citarasa Kopi (Coffea Sp) Dalam Pembuatan Kopi Bubuk. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis Dan Biosistem*, 1, 265-273.
- Patil, P.N., (2012). Caffeine In Various Samples And Their Analisis With HPLC – A Review. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences Review And Research*, 2, 76-83.
- Prastowo, Bambang dkk. (2010). *Budidaya dan Paska Panen Kopi*. Jakarta : Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Risky, Tika A. (2014). Aktivitas Antioksidan Dan Antikanker Ekstrak Metanol Tumbuhan Paku Adiantum philippensis L. *UNESA Journal of Chemistry*, 3, 89-95.
- Rohman, A. (2009). *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Yogyakarta : Graha Ilmu
- Skoog, D A., Holler, F J., Crouch, S R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis 6<sup>th</sup> Edition*. Canada : Thomson Brooks/Cole, P.
- Lloyd R. Snyder., Joseph J. Kirkland., John W. Dolan. (2010) *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition*. New Jersey : Wiley & Sons, Inc.
- Sudjadi., Rohman, A. (2008). *Analisis Kuantitatif Obat*. Yogyakarta : UGM Press
- Sugihartini, N., Fudholi, A., Pramono, S. (2014). Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Epigallocatekin Galat Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Pharmaciana*, 2. 112.
- United States Pharmacopeia Convention. (2009). *The United States Pharmacopeia 32-National Formulary 27 (USP32-NF27) 37<sup>th</sup> Edition*. Rockville USA : United States Pharmacopeia Inc.
- Utama, A. PW. (2014). Diversifikasi Produksi: Studi Ekonomi Politik Pedesaan Di Jawa. *Forum Ilmu Sosial*. 41. 2.