

**PENETAPAN KADAR KAFEIN PADA KOPI ROBUSTA  
LAMPUNG DENGAN BERBAGAI PERLAKUAN  
MENGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI CAIR  
KINERJA TINGGI (KCKT)**

**LAPORAN TUGAS AKHIR**

**BERRY KURNIAWAN**

**13151006**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI BANDUNG  
PROGRAM STUDI STRATA I FARMASI  
BANDUNG  
2017**

**PENETAPAN KADAR KAFEIN PADA KOPI ROBUSTA  
LAMPUNG DENGAN BERBAGAI PERLAKUAN  
MENGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI CAIR  
KINERJA TINGGI (KCKT)**

**LAPORAN TUGAS AKHIR**

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan  
Program Strata Satu

**BERRY KURNIAWAN  
13151006**

Bandung, Agustus 2017

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Serta,

(Winasih Rachmawati, M.Si., Apt.)

(Wendi Andriatna, M.Si.)

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi yang tidak dipublikasikan terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, dan terbuka untuk umum.

Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin pengarang dan harus disertai dengan kebiasaan ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh skripsi haruslah seizin Ketua Program Studi di lingkungan Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.

*Dipersembahkan kepada kedua orang tua, kakak – kakaku dan orang – orang terdekatku yang selalu memberikan dorongan motivasi dan curahan kasih sayang, perhatian, do'a yang berlimpah, materi dan cinta tak pernah berhenti, semoga senantiasa berada dalam lindungan Allah SWT..*

## Abstract

### **DETERMINATION OF KAFEIN CONDITIONS IN ROBUSTA LAMPUNG COFFEE WITH VARIOUS TREATMENT USING HPLC METHOD**

**By:**  
**BERRY KURNIAWAN**  
**13151006**

Coffee is a beverage that is very famous not only in Indonesia but around the world, the type that often encountered is Arabica and Robusta. Both species are rich sources of active compounds such as nicotinic acid, trigonellin, quinolinic acid, and caffeine. The previous research shows the difference of coffee processing effect on caffeine content. In this research, the processing of coffee with roasting treatment, green bean and fermentation by mungbean. Based on SNI 01-7152-2006 the maximum limit of caffeine in food and drink is 150mg / day and 50mg / serving. This research was conducted to find out the high levels of caffeine found in coffee Robusta Lampung with various treatments using HPLC method. The chromatographic system used consisted of column C18, 273nm UV detector, 0.9 mL / minute flow rate, methanol solvent and water-methanol phase (70:30). Previously done first validation method of analysis on the system to be used. The results showed that caffeine content in Robusta coffee Lampung green bean 2.92%; Robusta coffee Lampung that has been roasted 2.62%; And coffee robusta Lampung fermented mungbean 2.44%. There is a difference of caffeine content from the difference of treatment to the sample, where the content of coffee caffeine Robusta Lampung fermented by the mungbean has the least caffeine content compared to other samples.

**Keywords :** Caffeine concentration, determination, HPLC, Robusta coffee

## Abstrak

# PENETAPAN KADAR KAFEIN PADA KOPI ROBUSTA LAMPUNG DENGAN BERBAGAI PERLAKUAN MENGUNAKAN METODE KCKT

Oleh:  
**BERRY KURNIAWAN**  
**13151006**

Kopi merupakan bahan minuman yang sangat terkenal bukan hanya di Indonesia melainkan di seluruh dunia, jenis yang sering dijumpai yaitu Arabika dan Robusta. Kedua spesies ini merupakan sumber yang kaya akan senyawa aktif seperti asam nikotinat, trigonelin, asam quinolinat, dan kafein. Penelitian sebelumnya menunjukkan perbedaan proses pengolahan kopi berpengaruh terhadap kadar kafein. Pada penelitian ini dilakukan proses pengolahan kopi dengan perlakuan *roasting*, *green bean* dan fermentasi oleh luwak. Berdasarkan SNI 01-7152-2006 batas maksimum kafein dalam makanan dan minuman adalah 150mg/hari dan 50mg/sajian. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tinggi kadar kafein yang terdapat pada kopi Robusta Lampung dengan berbagai perlakuan menggunakan metode KCKT. Sistem kromatografi yang digunakan terdiri dari kolom C18, detektor UV 273 nm, laju alir 0,9 mL/menit, pelarut metanol, dan fase gerak air-metanol (70:30). Sebelumnya telah dilakukan terlebih dahulu validasi metode analisis pada sistem yang akan digunakan. Hasil menunjukkan bahwa kadar kafein pada kopi robusta Lampung *green bean* 2,92%; kopi robusta Lampung yang telah *diroasting* 2,62%; dan kopi robusta Lampung yang difermentasi luwak 2,44%. Terdapat perbedaan kadar kafein dari perbedaan perlakuan terhadap sampel, dimana kadar kafein kopi robusta Lampung yang difermentasi oleh luwak memiliki kadar kafein yang paling kecil dibandingkan sampel lainnya.

**Kata kunci** : Kafein, penetapan kadar, KCKT, kopi robusta

## KATA PENGANTAR

*Bismillahirrahmanirrahiim,*

*Alhamdulillahirrabbilalamiin,* segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat, ridho, dan kasih sayang-Nya, serta shalawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan tugas akhir yang berjudul **“Penetapan Kadar Kafein Pada Kopi Robusta Lampung dengan Berbagai Perlakuan Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)”**. Laporan tugas akhir ini diajukan sebagai salah satu dari syarat untuk memenuhi persyaratan kelulusan Program Strata Satu di Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.

Penyusunan laporan tugas akhir ini tidak akan terwujud tanpa bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Maka dari itu selayaknya penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Winasih Rachmawati, M.Si., Apt., selaku pembimbing utama dan Bapak Wendi Andriatna, M. Si., selaku pembimbing serta yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan. Semoga Allah membalas segala kebaikan beliau dengan rahmat-Nya.
2. Seluruh dosen dan seluruh civitas akademika STFB yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan laporan tugas akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun.

Akhir kata penulis mengucapkan *Jazakumullahu khairan katsira* dan semoga bermanfaat bagi para pembaca umumnya dan bagi penulis pada khususnya. Semoga Allah senantiasa melindungi kita serta memberikan petunjuk-Nya pada langkah kita selanjutnya. Amin.

Bandung, Agustus 2017

Penulis



## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
Bab I Pendahuluan.....	1
I.1.Latar belakang.....	1
I.2. Rumusan masalah.....	3
I.3. Batasan masalah.....	3
I.4. Tujuan penelitian.....	3
I.5. Manfaat penelitian.....	4
Bab II Tinjauan pustaka.....	4
II.1. Tanaman kopi.....	4
II.2. Jenis-jenis kopi.....	4
II.2.1 Kopi Arabika.....	5
II.2.2 Kopi Robusta.....	5
II.3. Pengolahan produk.....	8
II.4. Kopi Luwak.....	9
II.5. Kandungan kimia dan manfaat.....	10
II.6. Kafein.....	11
II.7. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).....	13
II.7.1 Prinsip kerja KCKT.....	14
II.7.2 Keuntungan KCKT.....	14
II.7. Instrumen KCKT.....	15
II.7.1 Teknik pemisahan dalam KCKT.....	20
II.7.2 Analisis dalam KCKT.....	21
II.8. Validasi metode.....	21
Bab III Metodologi penelitian.....	27
Bab IV Alat dan bahan.....	28
IV.1. Alat.....	28
IV.2. Bahan.....	28
Bab V Prosedur penelitian.....	29

V.1 Pembuatan larutan induk 1000 bpj .....	29
V.2 Uji kesesuaian sistem.....	29
V.3 Pembuatan kurva kalibrasi.....	29
V.4 Validasi metode .....	29
V.5 Penetapan kadar .....	31
Bab VI Hasil dan pembahasan .....	32
Bab VII Kesimpulan dan saran.....	39
VII.1. Kesimpulan .....	39
VII.2. Saran .....	39
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

## DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1. Kopi Robusta .....	7
Gambar II.2. Struktur kimia kafein .....	11
Gambar II.3. Instrumen KCKT .....	15
Gambar VI.1. Kromatogram baku kafein .....	33
Gambar VI.2. Kurva kalibrasi baku kafein.....	35

## DAFTAR TABEL

Tabel VI.1. Hasil uji kesesuaian sistem.....	34
Tabel VI.2. Hasil uji linieritas dan sensitifitas .....	36
Tabel VI.3. Hasil uji akurasi.....	37
Tabel VI.4. Hasil uji presisi.....	38
Tabel VI.5. Hasil penetapan kadar kafein .....	39

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Hasil optimasi fase gerak .....	43
Lampiran B. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi .....	44
Lampiran C. Perhitungan akurasi dan presisi .....	45
Lampiran D. Perhitungan kadar kafein.....	46

## **BAB I Pendahuluan**

### **I.1 Latar belakang**

Kopi merupakan bahan minuman yang sangat terkenal bukan hanya di Indonesia melainkan di seluruh dunia. Hal ini karena aroma serta rasanya yang khas dan tidak terdapat pada minuman lainnya. Kopi yang banyak kita jumpai di pasaran diproduksi dari dua jenis spesies tanaman berbeda yaitu *coffee arabica* dan *coffee robusta*. Kedua spesies ini merupakan sumber yang kaya akan senyawa aktif seperti asam nikotinat, trigonelin, asam quinolinat, asam tanat, asam pirogalat dan kafein. Kopi juga merupakan sumber penting dari polifenol, diantaranya yaitu asam kafeat, asam kumarat, asam ferulat, asam sinapat dan asam klorogenat (Hecimovic dkk., dalam Asep Sukohar dkk., 2011).

Dalam hal produksi Indonesia menempati urutan ketiga setelah Brazil dan Vietnam untuk jenis robusta dalam jumlah produksi 5,82 juta karung pada tahun 2007 dan meningkat pada tahun 2008 menjadi 6,01 juta karung (Choiron, 2010). Menurut pusat penelitian dan pengembangan perkebunan, produksi kopi di Indonesia pada 2011 mencapai 709.000 ton dan dari areal seluas 1,3 juta hektar, dimana sebanyak 68% dari total produksi diekspor ke luar negeri, sehingga kopi mempunyai peran sebagai penghasil devisa negara. Dari luasan 1,3 juta hektar tersebut, seluas 1,01 juta hektar (77,69%) merupakan pertanaman kopi robusta dan 290.000 hektar (22,31%) merupakan pertanaman kopi arabika.

Kopi luwak akhir – akhir ini banyak menjadi perhatian dikarenakan harganya yang mahal dan ketersediaannya yang sangat terbatas. Di Indonesia, kopi luwak pertama kali ditemukan di pulau Jawa, Sumatera dan Sulawesi. Kopi luwak ini diproses dalam sistem pencernaan musang. Musang memilih biji kopi yang terbaik dan sudah matang untuk dimakan pada malam hari, setelah mengalami proses fermentasi di dalam sistem pencernaan musang biji kopi dieksresikan melalui fesesnya dalam bentuk biji kopi yang masih utuh. Proses ini berpengaruh terhadap rasa dan aroma kopi yang dihasilkan (Marcone., dkk., dalam Erna Ciptaningsih, 2012).

Kafein merupakan suatu senyawa berbentk kristal. Penyusun utamanya adalah senyawa turunan protein disebut dengan purin xantin (Burnham, 2001). Berdasarkan *Food Drugs Administration* (FDA), dosis kafein yang diizinkan 100-200 mg/hari, sedangkan menurut SNI 01-7152-2006 batas maksimum kafein dalam makanan dan minuman adalah 150 mg/hari dan 50 mg/sajian.

Pada kopi luwak rendahnya kadar kafein pada biji kopi luwak disebabkan oleh keistimewaan proses fermentasi alami dalam sistem pencernaan luwak yang mampu mengurangi kadar kafein pada kopi. Sehingga pada kopi luwak baik bagi penikmat kopi yang memiliki toleransi rendah terhadap kafein (Badan Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar). Pada penelitian sebelumnya didapatkan hasil bahwa kopi luwak memiliki kandungan senyawa kafein yang lebih rendah. Oleh sebab itu diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui perbandingan kadar kafein dalam kopi robusta.

## **I.2 Batasan masalah**

Penelitian kali ini menggunakan sampel kopi yaitu kopi luwak robusta Lampung dan kopi robusta Lampung yang didapatkan dari daerah Lampung Barat. Metode penetapan kadar yang digunakan yaitu KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi).

## **I.3 Rumusan masalah**

1. Berapa kadar kafein pada kopi robusta Lampung yang telah di roasting, green bean dan kopi robusta Lampung yang telah mengalami fermentasi oleh luwak?
2. Apakah ada perbedaan terhadap kadar kafein pada kopi dengan perbedaan perlakuan?

## **I.4 Tujuan penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seberapa tinggi kadar kafein yang terdapat pada kopi robusta Lampung *green bean*, yang telah *diroasting* dan yang telah mengalami fermentasi oleh luwak. Adapun tujuan lainnya yaitu untuk mengetahui dan membandingkan kadar senyawa kafein tersebut dalam tiga perlakuan yang berbeda.

## **1.5 Manfaat penelitian**

Memberikan informasi kepada masyarakat tentang batas mengkonsumsi kopi sesuai dengan aturan.



## **BAB II Tinjauan Pustaka**

### **II.1 Tanaman Kopi**

Sejarah mencatat bahwa penyebaran tanaman kopi bermula pada 800 SM di benua Afrika. Saat itu, tanaman kopi banyak dijumpai tumbuh liar di hutan-hutan dataran tinggi Ethiopia. Penduduk Ethiopia bisaanya mengonsumsi kopi sebagai minuman yang enak dan berkhasiat. Seiring dengan popularitas minuman kopi yang mendunia, penyebaran tanaman kopi pun meluas ke negara-negara Arab, Eropa, Asia, dan Amerika. Di Indonesia sendiri, bibit kopi arabika pertama kali ditanam pada zaman kolonial Belanda, sekitar tahun 1600-an. Pada 1711, melalui perusahaan dagang Belanda / *Vereenigde Oostindische Compagnie* (VOC), ekspor kopi pertama dikirim dari Pulau Jawa ke Benua Eropa. Sejak itu, Indonesia dikenal sebagai negara yang membudidayakan tanaman kopi secara luas, di luar Arab dan Ethiopia. Perdagangan kopi sempat dimonopoli oleh VOC sekitar 1725 sampai 1780. Pada 1920, penanaman kopi mulai dilakukan oleh perusahaan-perusahaan kecil di Indonesia. Perkembangan areal perkebunan kopi semakin pesat setelah Indonesia merdeka, yakni mencakup area luar Jawa, seperti Aceh, Lampung, Sumatera Selatan, Sumatera Barat, Sumatera Utara, dan daerah lainnya (Anggara dan Marini, 2011).

### **II.2 Jenis – Jenis Kopi**

Jenis – jenis kopi di dunia sangat banyak dan beragam. Di Indonesia sendiri jenis kopi yang umumnya masyarakat ketahui adalah kopi robusta (*Coffea robusta*) dan kopi arabika (*Coffea arabica*).

### **II.2.1 Kopi Arabika (*Coffea arabica*)**

Kopi Arabika dapat tumbuh di daerah dengan ketinggian 700-1.700 mdpl, suhu 16-20° C, dan beriklim kering tiga bulan secara berturut-turut. Walaupun berasal dari Ethiopia, Kopi Arabika menguasai sekitar 70% pasar kopi dunia dan telah dibudidayakan di berbagai negara, terutama di negara beriklim tropis atau subtropis. Kopi Arabika memiliki tinggi antara 7-12 m. Keunggulan dari Kopi Arabika antara lain bijinya berukuran besar, beraroma harum, dan cita rasanya enak. Namun kelemahannya rentan terhadap penyakit karat daun / *Hemelia Vastatrix* (HV) (Anggara dan Marini, 2011).

Ciri-ciri dari Kopi Arabika adalah sebagai berikut:

1. Beraroma wangi yang sedap menyerupai aroma perpaduan bunga dan buah;
2. Terdapat cita rasa asam yang tidak terdapat pada kopi jenis Robusta;
3. Saat disesap di mulut akan terasa kental;
4. Cita rasanya jauh lebih lembut (*mild*) dari Kopi Robusta;
5. Rasa terasa sedikit pahit (Anggara dan Marini, 2011).

### **II.2.2. Kopi Robusta (*coffea robusta*)**

Kopi Robusta pertama kali ditemukan di Kongo pada 1898 dan mulai masuk ke Indonesia pada tahun 1900. Walaupun kualitas buahnya lebih rendah dari Kopi Arabika, produksinya bisa lebih tinggi dari Kopi Arabika jika dikelola secara intensif. Keunggulan lain dari Kopi Robusta diantaranya lebih resisten terhadap serangan hama dan penyakit (khususnya penyakit HV), mampu tumbuh dengan baik pada

ketinggian tempat 400-700 m dpl dan masih toleran di ketinggian tempat kurang dari 400 mdpl (suhu 21-24° C).

Secara umum, ciri-ciri dari kopi Robusta adalah sebagai berikut:

1. Memiliki rasa yang lebih menyerupai cokelat dan pahit;
2. Aroma yang dihasilkan khas dan manis;
3. Warna bijinya bervariasi, tergantung dari cara pengolahannya;
4. Teksturnya lebih kasar dari Kopi Arabika (Anggara dan Marini, 2011).

Kopi Robusta (*Coffea robusta*) adalah tanaman budidaya berbentuk pohon yang termasuk dalam famili Rubiaceae dan genus Coffea. Daunnya berbentuk bulat telur dengan ujung agak meruncing. Daun tumbuh berhadapan dengan batang, cabang, dan ranting-rantingnya. Permukaan atas daun mengkilat, tepi rata, pangkal tumpul, panjang 5-15 cm, lebar 4,0-6,5 cm, pertulangan menyirip, tangkai panjang 0,5-1,0 cm, dan berwarna hijau (Najiyati dan Danarti, 2012).



Gambar II.1. Kopi Robusta (*Coffea Robusta*)

Sumber: (Lampung Post, 2013).

Klasifikasi kopi menurut Cronquist (1981) adalah sebagai berikut:

Regnum	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Sub Divisio	: Spermatophyta
Class	: Magnoliopsida
Sub Class	: Asteridae
Order	: Rubiales
Family	: Rubiaceae
Genus	: Coffea
Species	: <i>Coffea robusta</i>

### II.3 Pengolahan Produk

Biji kopi yang sudah siap diperdagangkan adalah biji kopi kering yang sudah terlepas dari daging buah, kulit tanduk dan kulit ari. Butiran biji kopi yang demikian ini disebut kopi beras (*coffee beans*). Kopi beras kemudian akan mengalami proses *roasting*, penggilingan, pengemasan, hingga diperoleh kopi bubuk yang siap untuk dijual.

*Roasting* merupakan proses penyaringan biji kopi yang tergantung pada waktu dan suhu yang ditandai dengan perubahan kimiawi yang signifikan. Terjadi kehilangan berat kering terutama gas CO<sub>2</sub> dan produk pirolisis volatil lainnya. Kebanyakan produk pirolisis ini sangat menentukan cita rasa kopi. Berdasarkan suhu penyangraian yang digunakan kopi sangrai dibedakan atas tiga golongan yaitu : *light roast*, suhu yang digunakan 145-185° C, *medium roast*, suhu yang digunakan 185-195° C dan *dark roast*, suhu yang digunakan 196-205° C. Tahap awal *roasting* adalah membuang uap air pada suhu penyangraian 100° C. Pada tahap pirolisis terjadi perubahan – perubahan komposisi kimia, yaitu pada suhu sekitar 180-200° C. Proses *roasting* berlangsung 5-30 menit (Ridwansyah, 2003 dalam Hecimovic, I., dkk., 2011).

Proses fermentasi merupakan ciri khas dari proses pengolahan metode basah dari biji kopi sebelum menjadi kopi beras. Keunggulan dari metode ini adalah apabila proses pengerjaannya dilakukan dengan baik, maka kualitas biji kopi yang dihasilkan dapat terjaga dengan baik, seragam, dan sedikit yang mengalami kerusakan. Oleh karena itu, kopi yang diproduksi dengan cara ini biasanya memiliki harga

yang lebih tinggi. Proses fermentasi bertujuan untuk melepaskan daging buah berlendir yang masih melekat pada kulit tanduk dan pada proses pencucian akan mudah terlepas sehingga mempermudah proses pengeringan. Waktu yang dibutuhkan untuk menghilangkan lendir adalah sekitar 24-36 jam atau tergantung dari suhu, ketebalan lapisan lendir, dan konsentrasi enzim yang digunakan pada saat fermentasi. Hidrolisis pektin disebabkan oleh pektinase yang terdapat di dalam buah atau reaksinya bisa dipercepat dengan bantuan bantuan jasad renik (Ridwansyah, 2003; Kuniawan,A., 2011).

#### **II.4 Kopi Luwak**

Sejarah kopi Luwak (*Civet coffee*) terkait erat dengan sejarah pembudidayaan tanaman kopi di Indonesia. Pada awal abad ke-18, Belanda membuka perkebunan tanaman komersial di Indonesia terutama di pulau Jawa dan Sumatera. Belanda melarang pekerja perkebunan pribumi memetik buah untuk dikonsumsi secara pribadi, akan tetapi penduduk lokal sangat ingin mencoba minuman tersebut. Pekerja perkebunan menemukan bahwa ada sejenis musang yang gemar memakan buah kopi, tetapi hanya daging buahnya yang tercerna, kulit ari dan biji kopinya masih utuh dan tidak tercerna. Biji kopi dalam kotoran musang (luwak) ini kemudian dikumpulkan, dicuci, disangrai, ditumbuk, kemudian diseduh dengan air panas, maka terciptalah Kopi Luwak. Kabar mengenai kenikmatan kopi aromatik ini tercium oleh warga Belanda pemilik perkebunan, maka kemudian kopi ini menjadi kegemaran orang kaya Belanda. Karena kelangkaannya serta proses pembuatannya yang tidak lazim, Kopi

Luwak pun merupakan kopi yang mahal sejak zaman kolonial Belanda (Kurniawan, A., 2011).

Adapun tahapan pengolahan kopi luwak sebagai berikut:

- a. Buah kopi matang pohom dimakan oleh binatang luwak;
- b. Luwak hanya mencerna daging buah kopi, sedangkan biji kopi tetap utuh dan akan keluar bersama feses luwak  $\pm$  12 jam kemudian;
- c. Biji kopi yang tercampur feses dibersihkan lalu dijemur hingga benar – benar kering;
- d. Mengupas kulit tanduk biji kopi yang sudah kering;
- e. Biji Kopi Luwak siap dikemas dan disajikan baik dengan cara disangrai dengan oven maupun tradisional.

Dalam pengolahan Kopi Luwak perlu diperhatikan bahwa biji benar – benar dibersihkan, dijemur hingga kering, dikupas kulit tanduknya dan terakhir disangrai. Dalam hal Kopi Luwak disangrai secara tradisional, biasanya menggunakan panci besi atau kuali tanah diatas kayu bakar atau arang. Biji Kopi Luwak juga dapat disangrai dengan oven. Lama penyangraian akan menentukan warna Kopi Luwak, hitam, coklat kehitaman, dan kecoklatan (Kurniawan, A., 2011).

## **II.5 Kandungan Kimia dan Manfaat**

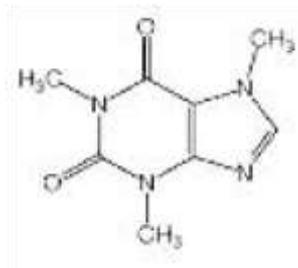
Kopi robusta memiliki banyak kandungan kimia pada bijinya seperti karbohidrat, senyawa nitrogen (protein, asam amino bebas, kafein, trigonelin), lemak (minyak kopi, diterpen), mineral, asam dan ester (asam klorogenat, asam kuinat). Senyawa-senyawa yang terkandung

dalam biji kopi robusta ini memiliki manfaat tertentu seperti asam klorogenat, kafein, trigonelin, serat terlarut dan diterpen memiliki peran penting untuk menghasilkan aroma pada minuman kopi. Kafein memiliki efek menstimulasi sistem saraf pusat sebagai antagonis reseptor adenosine (Farah, 2012).

Dalam penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Asep Sukohar dkk, Senyawa kafein dan asam klorogenat diuji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH. Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisien atau *efficient concentration* (EC50) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan persentasi penghambatan 50%.

## II.6 Kafein

Kafein mempunyai nama kimia 1,3,7- trimetil xantin atau 1,3,7-trimetil 2,6,dioksi purin. Rumus molekulnya  $C_8H_{10}N_4O_2$  dengan berat molekul 194.19 dan mempunyai struktur seperti dalam gambar.



Gambar II.2. Struktur kimia kafein.

Sumber: (Depkes RI, 1995).



Kafein berupa hablur bentuk jarum halus, mengkilat, tidak berwarna, rasa pahit, tidak berbau, jika dipanaskan akan menyublim tanpa penguraian pada suhu 178-180°C dan pada tekanan 1 atm. Kafein akan larut dalam 50 bagian air, 6 bagian air suhu 80°C, 1.5 bagian air mendidih, 75 bagian alkohol, 25 bagian alkohol suhu 60°C, 6 bagian kloroform dan 600 bagian eter. Berat molekul 194, 19 g/mol (Wilson dan Gisvold, 1982, dalam Fitri, 2008).

Kafein merupakan basa lemah, tidak berbentuk garam yang stabil dan dengan asam mineral segera terhidrolisa dalam air. Kelarutan kafein dalam air akan meningkat dengan adanya asam organik seperti benzoat, salisilat, sinamat atau sitrat. Karena itu bentuk campuran ini sering ditemui dalam sediaan farmasi (Clarke, 1971).

Kafein cepat diabsorpsi setelah pemberian oral, rektal atau parenteral. Sediaan bentuk cair atau tablet tidak bersalut akan diabsorpsi secara cepat dan lengkap. Kafein didistribusikan keseluruh tubuh, melewati plasenta dan masuk ke air susu ibu. Volume distribusi kafein adalah antara 400 dan 600 ml/kg eliminasi kafein terutama melalui metabolisme dalam hati. Sebagian dieksresikan bersama urin dalam bentuk utuh. Kafein didalam plasma akan mencapai konsentrasi maksimum pada waktu 1 jam dan waktu paruh plasma kofein antara 3-7 jam, nilai ini akan menjadi 2 kali lipat pada wanita hamil tua dan wanita yang menggunakan pil kontrasepsi jangka panjang. Pada penderita sirosis hati (pembentukan jaringan ikat di jaringan hati) atau udem paru akut, kecepatan eliminasi berlangsung lambat sekitar 60 jam, dan untuk

bayi premature waktu paruhnya 50 jam (Katzung, 1995; Tan dan Kirana, 1984).

## **II.7 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Metode pemisahan kromatografi didasarkan pada perbedaan distribusi molekul – molekul komponen diantara dua fasa (fasa gerak dan fasa diam) yang kepolarannya berbeda. Apabila molekul – molekul komponen berinteraksi secara lemah dengan fasa diam maka komponen tersebut akan bergerak lebih cepat meninggalkan fase diam. Keberhasilan pemisahan kromatografi bergantung pada daya interaksi komponen-komponen campuran dengan fasa diam dan fasa gerak.

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan hasil pengembangan kromatografi cair, yakni cair kolom. Teknologi kolom didasarkan atas penggunaan kolom berlubang kecil (diameter antara 2  $\mu\text{m}$  sampai 5  $\mu\text{m}$ ) dan isi kolom berupa partikel kecil (3 $\mu\text{m}$  sampai 5  $\mu\text{m}$ ) yang memungkinkan tercapainya keseimbangan secara cepat antara fase gerak dan fase diam. Adanya sistem pompa yang memberikan tekanan tinggi kepada fase gerak membuat tercapainya laju aliran hingga beberapa ml permenit, sehingga ia dinamakan kromatografi cair dengan kinerja tinggi (Effendy, 2004).

### **II.7.1 Prinsip Kerja KCKT**

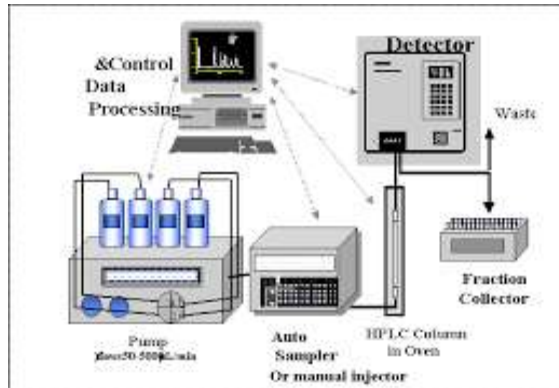
Prinsip kerja KCKT, fase gerak cair dialirkan dengan bantuan pompa melalui kolom ke detektor. Cuplikan dimasukkan ke dalam aliran fase gerak dengan cara penyuntikan. Di dalam kolom terjadi pemisahan

komponen – komponen cairan. Karena perbedaan kekuatan interaksi antara obat solut terhadap fase diam. Solut – solut yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom lebih dahulu dan sebaliknya. Setiap komponen campuran yang keluar dari kolom dideteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram. Jumlah peak menyatakan jumlah komponen sedangkan luas *peak* menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran.

### **II.7.2 Keuntungan KCKT**

Keuntungan analisis menggunakan KCKT adalah membutuhkan waktu analisis yang relatif cepat, daya pisah baik, sensitif hingga kadar nanogram/mililiter, pemilihan kolom dan eluen bervariasi, kolom dapat dipakai kembali, dapat digunakan untuk menganalisis senyawa dengan molekul besar dan kecil, dapat menganalisis sampel yang termolabil karena dilakukan pada suhu kamar, dan dapat menganalisis campuran yang mempunyai titik didih sangat tinggi (Harmita, 2006).

## II.8 Instrumen KCKT



Gambar II.3. Instrumen KCKT

Sumber : <http://www.forumsci.co.il>

### 1. Wadah fase gerak

Wadah fase gerak berisi fase gerak yang digunakan untuk memisahkan komponen sampel.

### 2. Fase gerak.

Fase gerak KCKT berupa zat cair, disebut juga eluent atau pelarut. Fase gerak berfungsi membawa komponen-komponen campuran menuju detektor, fase gerak dapat berinteraksi dengan solut-solut. Oleh karena itu, fasa gerak dalam KCKT merupakan salah satu faktor penentuan keberhasilan proses pemisahan.

Persyaratan fasa gerak KCKT:

- a. Zat cair harus bertindak sebagai pelarut yang baik untuk cuplikan yang akan dianalisis;
- b. Zat cair harus dalam keadaan murni;
- c. Zat cair mudah diperoleh, murah, tidak mudah terbakar, dan tidak beracun;
- d. Zat cair tidak kental, kekentalan tidak melebihi 0,5 cp;
- e. Sesuai dengan detektor. Contoh, untuk detektor refraktif indeks pelarut harus punya indeks bias yang berbeda dengan solut. Untuk detektor UV, pelarut tidak boleh menyerap cahaya pada panjang gelombang yang dipakai;
- f. Zat cair harus jernih sekali untuk menghindarkan penyumbatan pada kolom. Biasanya pelarut disaring dengan saringan nilon berukuran diameter pori 0.45  $\mu\text{l}$  pompa vakum biasanya digunakan untuk menyaring partikel kotoran sekaligus menghilangkan gas dari pelarut.

Berdasarkan kepolaran fasa diam dan fasa gerak, KCKT dikelompokkan atas KCKT fasa normal dan fasa terbalik. Pada fasa normal, fasa diam yang digunakan bersifat polar, contoh silika, alumina, atau zat cair polar trietilen aglikol yang dilapiskan pada partikel silika. Sebagai fasa geraknya digunakan pelarut yang relatif non polar seperti heksana atau propileter.

Obat pada umumnya bersifat polar. Cuplikan polar tidak bisa dipisahkan menggunakan fasa normal. Sehingga kombinasi fase gerak dan fase diamnya dibalik. KCKT fase terbalik menggunakan fase diam yang

bersifat non polar dan fase gerak bersifat polar. Fase gerak yang umum digunakan adalah air, etanol, atau asetonitril. Umumnya fase gerak yang digunakan dalam KCKT fase terbalik adalah kombinasi metanol atau asetonitril dalam air dengan berbagai perbandingan.

Pemilihan zat cair sebagai fasa gerak ini merupakan hal yang kritis dalam keberhasilan pemisahan. Sampai saat ini pemilihan fasa gerak masih berdasarkan eksperimen trial dan error karena belum ada teori interaksi fasa gerak dengan sejumlah solut. *Trial error* dilakukan hingga diperoleh kromatogram yang sesuai harapan.

Untuk cuplikan 2-3 komponen sebaiknya dicari fasa gerak yang memberikan  $k'$  antara 2-5, sedangkan untuk campuran multikomponen rentang  $k'$  harus diperlebar hingga 5-20 sehingga sejalan waktu cukup untuk pemisahan sesuai komponen. Biasanya beberapa pelarut dapat ditemukan untuk memberikan faktor kapasitas yang cocok. Pemilihan pelarut-pelarut juga bergantung pada faktor selektivitas untuk komponen cuplikan (Effendy, 2004).

### 3. Pompa

Pompa berfungsi untuk mengalirkan fasa gerak cair melalui kolom yang berisi serbuk halus.

Pompa yang dapat digunakan dalam KCKT harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

- a. Menghasilkan tekanan sampai 600 psi (pons/in<sup>2</sup>);
- b. Keluaran bebas pulsa;

- c. Kecepatan air berkisar antara 0,1-10 l/menit;
- d. Bahan tahan korosi.

#### 4. Pemasukan injektor

Faktor ketidaktepatan pengukuran KCKT terletak pada keterulangan pemasukan cuplikan ke dalam *packing* kolom. Memasukkan cuplikan kedalam kolom terlalu banyak dapat menyebabkan *band broadening*. Maka cuplikan yang dimasukkan harus sekecil mungkin, yakni beberapa puluh mikroliter.

#### 5. Kolom

Kolom terbuat dari *stainless steel* walaupun kadang ada juga yang terbuat dari gelas berdingding tebal. Kolom pertama berisi fasa diam, tempat terjadinya pemisahan campuran menjadi komponen-komponennya. Bergantung keperluannya, kolom utama dapat digunakan untuk analisis atau preparatif. Kolom utama untuk KCKT biasanya berukuran panjang berkisar antara 5 sampai 30 cm dan diameter dalam berkisar antara 4-10 mm. Dalam KCKT, kolom utama diletakkan setelah sistem pemasukan cuplikan. Kolom utama yang dipakai berukuran panjang 25 cm, diameter dalam 4,6 mm dan diisi dengan partikel 5  $\mu\text{m}$ . Kolom utama berukuran demikian memiliki harga N sebesar 40.000-60.000 plat/meter. Kolom yang lebih pendek dengan partikel lebih kecil dapat memberikan jumlah plat yang lebih besar. Contoh, kolom yang panjangnya 5 cm, diameter dalam 4,6 mm dengan partikel 3  $\mu\text{m}$  mempunyai pelat sekitar 100.000 plat/meter.

Kolom utama berisi fasa diam dan jenisnya bervariasi bergantung keperluan misalnya dikenal kolom C-18, C-8, cyanopropyl, penukar ion. Kolom jenis C-18 dan C-8 paling banyak digunakan. Fasa diam jenis terikat ini dibuat dengan mereaksikan silika dengan alkilchlorosilana yang dikenal dengan reaksi silanisasi. R adalah gugus alkil rantai lurus dan R biasanya n-oktil (C-8) atau n-oktadesil (C-18). Reaksi ini dimaksudkan untuk menutupi gugus silanol (SiOH) yang sangat polar. Dengan cara ini, penutupan permukaan silanol terbatas hingga 4  $\mu\text{mol}$  atau kurang karena faktor ruah. Gugus silanol yang masih tersisa memberi banyak kepolaran pada permukaan yang dapat menyebabkan terjadinya tailing terutama untuk solut yang bersifat basa. Untuk memperkecil pengaruh ini maka hasil silanisasi direaksikan lagi dengan kloroetilsilana, karena ukurannya yang kecil sehingga dapat bereaksi dengan gugus silanol. Silanisasi juga dapat dilakukan dengan dwifungsi (alkil etil diklorosilana) dan trifungsi (alkil triklorosilana) yang lebih reaktif daripada reaksi monokloro. Sekarang diperkirakan tiga per empat pemisahan KCKT dilakukan pada fase diam oktil atau oktadesilsiloksana.

## 6. Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi solut-solut yang keluar dari kolom analitik. Jenisnya ada yang bersifat umum misal indeks bias dan spesifik misal UV-elektrokimia. Untuk senyawa organik biasanya menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 254 nm. Persyaratan detektor yang digunakan untuk KCKT adalah sensitif, stabilitas dan keterulangan tinggi, respon linier terhadap solut, waktu



respon pendek sehingga tidak bergantung pada kecepatan alir, reliabilitas tinggi dan mudah digunakan, serta tidak merusak cuplikan.

Ada tiga macam detektor:

- a. Detektor umum: memberi respon terhadap fasa gerak yang dimodulasi dengan adanya solut;
- b. Detektor spesifik memberi respon terhadap beberapa sifat solut yang tidak dimiliki oleh fase gerak;
- c. Detektor yang bersifat umum terhadap solut setelah fasa gerak dihilangkan dengan penguapan.

### **II.7.1 Teknik Pemisahan Dalam KCKT**

Teknik pemisahan dalam KCKT terdiri dari beberapa sistem yaitu, sistem isokratik dan sistem gradien.

#### **a. Sistem isokratik**

Merupakan suatu teknik pemisahan dimana selama proses analisis berlangsung, fase gerak atau komposisi fase gerak tidak berubah, artinya polaritasnya tetap.

#### **b. Sistem gradien**

Teknik ini dilakukan dengan tujuan memisahkan campuran dengan polaritas yang beragam. Komposisi fase gerak berubah secara berperiodik, merupakan suatu teknik pemisahan dimana selama proses analisis berlangsung, (Harmita, 2006).

### **II.7.2 Analisis Dalam KCKT**

Analisis dalam KCKT terdiri dari analisis kualitatif dan analisis kuantitatif.

#### **a. Analisis kualitatif**

Data waktu retensi khas tetapi tidak spesifik, artinya terdapat lebih dari satu komponen zat yang mempunyai waktu retensi sama. Maka perlu dilakukan lagi uji kemurnian puncak dari spektrofotometri. Cara yang terbaik adalah dengan menggunakan waktu relatif.

#### **b. Analisis kuantitatif**

Meliputi tahapan membuat spektrum serapan komponen-komponen yang mempunyai gugus kromofor yang ada dalam sampel, mencari panjang gelombang maksimum untuk penetapan komponen, dan mencari fase gerak yang sesuai agar komponen-komponen tersebut memisah. Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen yang dianalisis adalah dengan mengukur luas atau tinggi puncaknya (Harmita, 2006).

### **II.9 Validasi Metode Analisis**

Tujuan utama yang harus dicapai dari suatu kegiatan analisis kimia adalah dihasilkannya data hasil uji yang absah (valid). Data yang valid tersebut diperoleh dari metode yang valid. Untuk memperolehnya maka perlu dilakukan kegiatan validasi. Validasi diartikan sebagai kegiatan konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti yang objektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud khusus harus dipenuhi. Validasi metode analisis adalah suatu proses penilaian

terhadap metode analisis tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa metode tersebut memenuhi persyaratan untuk digunakan (Harmita, 2004).

Selain itu, validasi metode dilakukan jika terjadi perubahan kondisi antara kondisi analisis dan kondisi pada saat validasi metode, atau terjadi perubahan metode dari metode standar. Beberapa manfaat validasi metode analisis adalah untuk mengevaluasi kerja suatu metode analisis, menjamin prosedur analisis, menjamin keakuratan dan kedapat-ulangan hasil prosedur analisis, dan mengurangi resiko penyimpangan yang mungkin timbul (Wulandari, 2007).

Dalam proses validasi metode, parameter-parameter unjuk kerja metode ditentukan dengan menggunakan peralatan yang memenuhi spesifikasi, bekerja dengan baik dan terkalibrasi secara memadai. Secara umum, validasi metode mencakup penentuan yang berkaitan dengan alat dan metode (Nugroho, 2006). Ada 8 parameter validasi metode analisis menurut *United States Pharmacopeia* (USP) yaitu linearitas dan kisaran, limit deteksi, limit kuantitasi, spesifisitas, presisi, akurasi, kekasaran, dan ketahanan. Sedangkan menurut ICH (*International Conference on Harmonization*) validasi ada 9 parameter yaitu akurasi, presisi, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesifisitas, linieritas, kisaran, ketahanan, kesesuaian sistem (Gandjar, 2007).

### 1. Linearitas dan rentang

Linearitas merupakan suatu kemampuan metode analisis untuk memperoleh hasil – hasil uji yang secara langsung proposional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Kisaran suatu metode merupakan konsentrasi terendah dan tertinggi dimana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linearitas yang mencukupi. Rentang konsentrasi yang akan diuji tergantung pada jenis metode dan kegunaannya.

Linearitas biasanya dinyatakan dalam garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi, sehingga diperoleh hubungan  $Y = a + bx$ . Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai  $b = 0$  dan  $r = +/- 1$ . Sedangkan nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan.

### 2. Batas deteksi (BD)

Limit deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko.

Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko. Limit ini dapat diukur secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi dengan rumus :

$$BD = \frac{3.3 \cdot \text{noise}}{b}$$

### 3. Batas kuantisasi (BK)

Batas kuantifikasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Limit ini dapat diukur secara statistik melalui garis regresi linier dan kurva kalibrasi dengan rumus:

$$\text{BK} = \frac{10, \text{noise}}{b}$$

### 4. Spesifitas

Spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks. ICH membagi spesifisitas dalam 2 kategori, yakni uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran.

### 5. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relative dari jumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistic. Sesuai dengan ICH, presisi harus dilakukan pada 3 tingkatan yang berbeda yaitu keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*), dan ketertiruan (*reproducibility*).

### 6. *Ruggedness*

*Ruggedness* merupakan tingkat reproduksibilitas hasil yang diperoleh dibawah kondisi yang bermacam-macam yang diekspresikan sebagai

persen standart deviasi relatif (% RSD). Kondisi-kondisi ini meliputi laboratorium, analisis, alat, reagen, dan waktu percobaan yang berbeda.

#### 7. *Robustness*

*Robustness* merupakan kapasitas metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Ketahanan dievaluasi dengan melakukan variasi parameter-parameter metode seperti persentase pelarut organik, pH, kekuatan ionik, suhu, dan sebagainya.

#### 8. Stabilitas

Untuk memperoleh hasil-hasil analisis yang reproduibel dan reliabel, maka sampel, reagen dan baku yang digunakan harus stabil pada waktu tertentu.

#### 9. Uji kesesuaian sistem

Sebelum melakukan analisis setiap hari, seorang analis harus memastikan bahwa sistem dan prosedur yang digunakan harus mampu memberikan data yang dapat diterima. Hal ini dapat dilakukan dengan percobaan kesesuaian sistem yang didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Persyaratan-persyaratan uji kesesuaian sistem biasanya dilakukan setelah dilakukan pengembangan metode dan validasi metode analisis (Gandjar, 2007).

#### 10. Ketepatan (Akurasi)

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan *spiking* pada suatu sampel. Untuk pengujian senyawa obat, akurasi diperoleh dengan membandingkan hasil pengukuran dengan bahan rujukan standar (*standard reference material, SRM*).