

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki kekayaan alam yang berlimpah, terutama pada hasil perkebunan. Komoditas perkebunan Indonesia di antaranya tembakau, kopi, dan masih banyak lagi. Kopi memiliki peran dalam pertumbuhan ekonomi di Indonesia (Abur, 2021). Selain itu, kopi juga banyak diminati oleh masyarakat sehingga membuat para petani banyak memilih untuk menanam kopi. Hal ini dibuktikan dengan luasnya lahan perkebunan kopi yang dimiliki petani di Indonesia per tahun 2016 yaitu sekitar 1.233.294 ha. Sebagian besar kopi yang dikonsumsi oleh masyarakat adalah kopi yang telah diolah. Kopi olahan dapat berupa kopi dalam kemasan, kopi dalam plastik, dan produk olahan kopi lainnya (Mir'ah, 2022). Perkembangan kopi yang pesat membuat minuman kopi menjadi kebiasaan dan budaya masyarakat pedesaan maupun perkotaan (Yuliyana et al., 2021).

Popularitas dan daya tarik kopi dikarenakan rasanya yang unik serta didukung oleh faktor sejarah, tradisi, sosial dan kepentingan ekonomi. Hal ini dapat dibuktikan dengan maraknya warung kopi di pinggir jalan, rumah makan maupun *cafe* yang menyajikan kopi di dalam menu yang ditawarkan (Citra, 2019). Kopi menjadi salah satu tumbuhan yang mengandung kafein yang ditemui dalam kopi kemasan atau kopi dalam plastik. Kafein merupakan salah satu jenis alkaloid yang banyak terdapat dalam biji kopi, daun teh, dan biji coklat (Fajriana et al., 2018). Kafein memiliki sifat adiktif yang dapat mempengaruhi sistem saraf pusat, terutama dengan menghambat aksi adenosin dan neurotransmitter yang berperan dalam mengatur rasa kantuk (Eticha & Bedassa, 2020). Namun, tidak semua produk kopi mencantumkan kadar kafein didalamnya, sehingga disarankan mengonsumsi kafein dengan jumlah yang diizinkan. SNI 01-7152-2006 menyatakan bahwa batas maksimum jumlah kafein yang dapat dikonsumsi setiap hari tidak boleh melebihi 50 mg per sajian atau 150 mg per hari (Hana, 2021).

Penentuan kadar kafein dapat dilakukan dengan berbagai metode, seperti spektrofotometri UV-Vis, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan *Infra Red*. Namun, metode spektrofotometri UV-Vis lebih sering digunakan dikarenakan keunggulannya seperti biaya yang lebih murah, dapat menganalisis larutan dengan konsentrasi yang sangat kecil, memiliki tingkat kepekaan dan selektifitas analisis yang tinggi (Abur, 2021). Kinerja metode analisis merupakan proses pembuktian atau konfirmasi hasil pengujian yang objektif di laboratorium, sehingga metode yang digunakan dengan hasil yang didapatkan telah memenuhi persyaratan yang ditetapkan untuk penggunaannya (Harmita, 2004).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Aprilia et al. (2023) mengenai kadar kafein pada minuman kopi kekinian di Bekasi timur menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis menunjukkan bahwa 2 dari 11 sampel memiliki kadar kafein yang melebihi batas persyaratan konsumsi SNI. Selain itu penelitian Nia et al. (2023) pada pengujian validasi menunjukkan hasil linear ($r = 0,992653$), batas deteksi

(LOD = 25,9344), batas kuantitatif (LOQ = 78,5893), akurasi (Recovery = 106,7%), dan presisi (RSD = 1,593%) dengan menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-Vis. Oleh karena itu, untuk mengetahui kadar kafein yang terkandung pada kopi, kinerja instrumen dan memastikan bahwa metode analisis yang digunakan dapat memberi hasil yang valid, dapat dipercaya, serta dapat dipertanggungjawabkan maka dilakukan pengujian kinerja analitik. Adapun parameter uji yang dilakukan adalah linearitas, presisi, akurasi, limit kuantitasi, limit deteksi, dan ketangguhan metode.

1.2 Teori

1.2.1 Kopi

Tanaman kopi merupakan tanaman yang berasal dari Benua Afrika, tepatnya dari negara Ethiopia pada abad ke-9. Tanaman kopi menyebar ke Benua Eropa oleh seorang yang berkebangsaan Belanda dan terus ke negara lain termasuk ke wilayah jajahannya yaitu Indonesia. Penyebaran tanaman kopi di Indonesia terjadi sejak tahun 1700-an, khususnya di pulau Jawa. Selain di Jawa, penyebaran dilakukan juga di Sumatera dan Sulawesi. Jenis kopi yang pertama kali dibudidayakan di Indonesia adalah jenis kopi arabika dan seiring dengan waktu pemerintahan Belanda mendatangkan 5 jenis kopi, salah satunya kopi robusta (Fajriana et al., 2018).

Kopi merupakan jenis tanaman yang dikenal dengan *familia rubiaceae gebus coffea*. Tanaman kopi adalah jenis tanaman dikotil, memiliki dua bagian biji dengan tinggi pohon yang mencapai 10 meter yang tumbuh di alam bebas. Ciri-ciri tanaman kopi memiliki batang terkulai dengan daun berpasangan sekitar 15 cm, daun berbentuk oval atau lanset, dan berwarna hijau tua dengan kilaun. Bunga pada spesies kopi berwarna putih dengan aroma yang harum. Buah kopi terdiri dari kulit buah terluar (epikarp), daging buah (mesokarp), kulit biji yang keras (endokarp), dan membutuhkan waktu sekitar satu tahun untuk matang (Rasmi, 2023).

Tanaman kopi memiliki banyak jenis antara lain *Coffea arabica*, *Coffea robusta*, dan *Coffea liberica* tetapi, jenis kopi arabika dan kopi robusta yang dikenal di Indonesia. Secara taksonomi kopi (*Coffea* sp.) dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Citra, 2019):

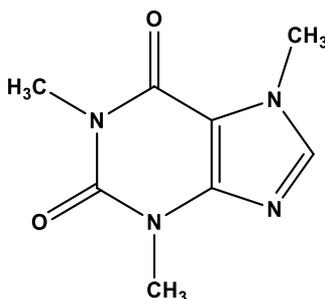
Kingdom : Plantae
Divisio : Tracheophyta
Subdivision : Spermatophyta
Infradivision : Angiospermae
Class : Magnoliopsida
Ordo : Gentianales
Family : Rubiaceae
Genus : Coffea

Rasa dan bau yang terdapat pada kopi disebabkan karena adanya kandungan senyawa-senyawa kompleks yang berbeda dalam tiap jenis kopi yang memiliki potensi mempengaruhi proses metabolisme. Senyawa kompleks pada kopi terdiri dari kafein, trigonelin, senyawa fenolik seperti asam klorogenat, senyawa-senyawa terpenoid yaitu cafestol dan kahweol, dan senyawa nutrisi seperti karbohidrat,

protein, lemak, tanin, dan mineral. Senyawa-senyawa yang terkandung ini merupakan kontributor penting sebagai fungsi terapi potensial dan sebagai agen pencegahan (Latunra et al., 2021).

1.2.2 Kafein

Kafein merupakan senyawa jenis alkaloid heterosilik yang termasuk dalam golongan *methylxantine*. Kandungan kafein pada tanaman berperan sebagai metabolit sekunder yang berfungsi sebagai pestisida alami yang dapat melumpuhkan dan membunuh serangga yang ingin memakan tumbuhan tersebut (Mudigiri dan Jorige, 2022). Kafein merupakan alkaloid putih dengan rumus senyawa kimia $C_8H_{10}N_4O_2$, dan rumus bangun 1,3,7-trimetilxantin. Gugus metilnya berikatan dengan ketiga hidrogen dan nitrogen pada cincin *xanthin* (Citra, 2019). Kafein berbentuk serbuk putih yang tidak berbau, berat molekul 194,19 g/mol, densitas 1,23 g/cm³, kelarutan dalam air 2,2 mg/ml, titik didih 178°C dan titik leleh 235°C. Kafein tersusun dari ikatan cincin pirimidina dan cincin imidazol, memiliki atom karbon (C), hidrogen (H), nitrogen (N), dan oksigen (O) (Sri, 2021).



Gambar 1. Struktur Kafein (Citra, 2019)

Kafein merupakan senyawa terpenting yang terkandung dalam biji kopi. Selain dalam biji kopi, kafein secara alami ditemukan dalam daun teh, coklat, dan buah dari 60 lebih spesies tanaman. Kafein dapat mempengaruhi citarasa dan aroma kopi sehingga kopi menjadi pahit (Olivia, 2012). Rasa pahit pada kopi disebabkan oleh kandungan mineral bersama dengan pemecahan serat kasar, asam klorogenat, kafein, dan tanin (Citra, 2019). Selain itu, Kafein juga dapat digunakan sebagai bahan tambahan dalam minuman berenergi dan campuran pada obat (Lilis, 2020).

Kafein memiliki efek farmakologis yang beragam disebabkan karena mekanisme kerja mobilisasi kalsium intrasellular, peningkatan akumulasi nukleotida siklik karena hambatan phosphodiesterase, dan antagonisme reseptor adenosine (Afriliana, 2018). Kafein bekerja di dalam tubuh dengan mengambil alih reseptor adenosin dalam sel saraf yang dapat memicu produksi hormon adrenalin dan mengakibatkan peningkatan tekanan darah, sekresi asam lambung, aktifitas otot, dan perangsangan hati untuk melepas senyawa gula pada aliran darah untuk menghasilkan energi ekstra (Ikrawan, 2007).

Mengonsumsi kafein dapat menyebabkan respons pada reseptor D1 dan D2 dopaminergik dan pelepasan neurotransmitter, seperti norepinefrin, dopamin,

serotonin, dan sifat psikomotor yang menstimulasi dan meningkatkan fungsi perilaku. Pada dosis rendah hingga sedang, kafein dapat memberikan efek positif pada suasana hati dan perilaku manusia seperti peningkatan energi, kepercayaan diri, kewaspadaan dan fokus (Nawrot, 2003). Kafein dengan dosis yang tinggi dapat menyebabkan efek negatif bagi tubuh seperti kecemasan, kegugupan, gelisah dan insomnia (Farah, 2018). Selain itu, mengonsumsi kafein secara berlebihan dapat menyebabkan warna gigi berubah, bau mulut, meningkatkan stress dan tekanan darah jika mengonsumsi di pagi hari, serangan jantung, stroke, kemandulan pada pria, gangguan pencernaan, kecanduan, pengeroposan tulang (osteoporosis) bahkan penuaan dini (Hastuti, 2018).

1.2.3 Kinerja Analitik

Laboratorium kimia yang melaksanakan fungsi pengujian dengan analisis kimia untuk parameter yang terkait dengan baku mutu produk lingkungan dan identik dengan kegiatan pengendalian mutu. Hal pertama yang harus dilakukan laboratorium dalam menentukan kehandalan pengujian yang digunakan dalam analisis menghasilkan hasil yang valid yaitu dengan kinerja analitik (Hadi, 2021). Kinerja analitik merupakan suatu tindakan uji kelayakan terhadap suatu metode baku maupun metode yang dikembangkan sebelum diterapkan di laboratorium. Kinerja analitik bertujuan untuk memastikan bahwa laboratorium tersebut mampu melakukan pengujian menggunakan metode uji serta menghasilkan data yang valid. Kinerja analitik dibedakan menjadi dua, yaitu validasi dan verifikasi. Validasi metode merupakan suatu proses (percobaan laboratorium) untuk membuktikan bahwa karakteristik kinerja metode analisis telah memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan sebelumnya, sedangkan verifikasi metode adalah suatu proses (percobaan laboratorium) untuk membuktikan bahwa laboratorium mampu menggunakan metode analisis baku/standar pada kondisi nyata di laboratorium (Kartika, 2021). Perbedaan dari validasi dan verifikasi metode terletak pada metode. Metode yang digunakan pada validasi adalah metode tidak baku, seperti jurnal, metode dari *manual book* alat, dan lainnya. Sementara itu, metode yang digunakan verifikasi yaitu metode pengujian standar seperti ISO, SNI, AOAC, EURACHEM, dan standar lainnya. Validasi dan verifikasi metode merupakan langkah awal yang memastikan hasil yang valid atau tidak, sehingga jika dilakukan validasi dan verifikasi metode maka metode tersebut dapat digunakan untuk pengujian harian di laboratorium (Riyanto, 2014). Adapun parameter validasi dan verifikasi metode, yaitu akurasi (ketelitian), presisi (ketepatan), linearitas, limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ), ketangguhan (*ruggedness*) dan ketahanan (*robustness*), sensitifitas, serta selektivitas (Kartika, 2021).

Akurasi merupakan ukuran analisis yang menunjukkan kedekatan hasil uji yang diperoleh dengan hasil sebenarnya (Nia, 2023). Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi dapat ditentukan dengan berbagai cara, seperti metode penambahan baku standar, dan perbandingan dengan metode lain. Presisi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kesamaan dari hasil uji individual dengan mengukur simpangan baku atau

simpangan relatif (Harmita, 2004). Presisi dapat dibagi menjadi keterulangan (*repeatability*) dan ketertiruan (*reproducibility*). *Repeatability* adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek, sedangkan *reproducibility* adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda. Presisi dapat dilihat melalui pengukuran SD (standar deviasi) dan KV (koefisien variasi) (Aprilia, 2023).

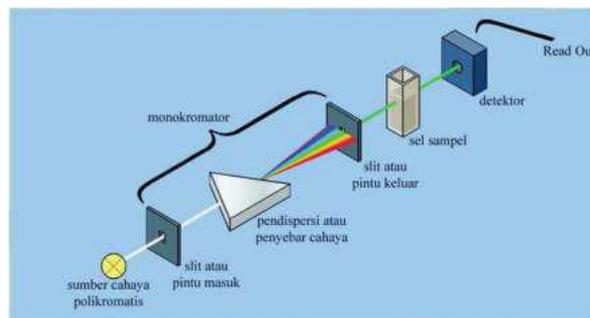
Linearitas merupakan metode analisis uji untuk memastikan adanya hubungan yang linear antara konsentrasi analit dan sinyal atau respon detektor yang dinyatakan dalam garis regresi (Pebriana et al., 2017). Linearitas merupakan parameter ukuran seberapa baik kurva kalibrasi antara respon (y) dan konsentrasi (x), pengukurannya dilakukan dengan cara pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda dengan ditentukan nilai *slope*, *intercept*, dan koefisien korelasinya (Afifah, 2016). Uji linieritas dapat ditentukan dengan cara membuat kurva kalibrasi dari berbagai konsentrasi sebanyak minimum lima konsentrasi yang berbeda dan hubungan linieritas yang digunakan yaitu koefisien korelasi (r) dan koefisien determinasi (R^2) (Harmita, 2004). Linearitas suatu metode akan memenuhi syarat apabila diperoleh nilai koefisien korelasi $\geq 0,995$ (AOAC, 2005). *Limit of Detection* (LOD) merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon yang signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas (Maramis et al., 2013). *Limit of Quantification* (LOQ) adalah parameter yang menunjukkan jumlah terkecil dari analit yang terkandung dalam sampel yang dapat dikuantifikasi secara presisi dan akurat (Arwangga et al., 2016). Penentuan batas deteksi menggunakan instrumen dapat dilakukan dengan mensubstitusikan kromatogram dari data yang diperoleh ke dalam persamaan regresi linier. Apabila konsentrasi analit yang diperoleh berada dibawah limit deteksi maka sinyal yang ditangkap detektor adalah *noise*, sehingga konsentrasi analit yang berada dibawah limit deteksi memiliki akurasi yang rendah. Nilai LOD dan LOQ diperoleh berdasarkan pada standar deviasi. Nilai LOD diperoleh tiga kali standar deviasi x/y dibagi dengan *slope*, sedangkan nilai LOQ sepuluh kali standar deviasi x/y dibagi dengan *slope* dari persamaan regresi (Elyta, 2018).

Robustness (ketahanan) adalah kestabilan dari metode analisis yang tidak terpengaruh dari variasi yang diberikan. Metode yang baik yaitu metode yang stabil meskipun dilakukan perlakuan yang berbeda, hal ini akan menentukan kekuatan dari metode yang digunakan (Lilis, 2020). Dilakukannya perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus lalu mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi, untuk memvalidasi kekuatan suatu metode. *Ruggedness* (ketangguhan) adalah ketertiruan hasil uji yang diperoleh pada kondisi normal antara laboratorium dan analis. Ketangguhan diartikan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji (Harmita, 2004). Spesifitas atau selektivitas adalah parameter yang menunjukkan kemampuan mengukur suatu analit yang dituju secara tepat dan spesifik walaupun adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel (Elyta, 2018).

1.2.4 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode analisis yang menggunakan panjang gelombang UV dan Visibel sebagai area serapan untuk mendeteksi molekul atau senyawa (Tati, 2017). Spektrofotometer UV-Vis merupakan instrumen yang digunakan untuk mengukur absorbansi dari suatu senyawa pada panjang gelombang tertentu. Pengukuran spektrofotometer UV-Vis dilakukan pada rentang panjang gelombang 200-700 nm (Irawan, 2019). Analisis secara spektrofotometri terdapat tiga daerah panjang gelombang elektromagnetik yang digunakan yaitu sinar ultraviolet berada pada panjang gelombang 200-380 nm, sinar tampak berada pada panjang gelombang 380-700 nm, dan inframerah pada panjang gelombang 700-3000 nm (Latunra et al., 2021).

Metode spektrofotometri memiliki beberapa keuntungan yaitu memberikan metode sederhana untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil, sensitivitas yang tinggi, dan juga terjangkau (Navvara et al., 2017). Prinsip kerja dari spektrofotometer UV-Vis yaitu interaksi sumber cahaya yang dihasilkan terhadap molekul berupa cahaya polikromatik akan mengalami transisi elektronik dan menghasilkan cahaya monokromatik. Ketika cahaya monokromatik melewati suatu media berupa larutan maka cahaya tersebut sebagian akan diserap, dipantulkan, dan dipancarkan (Mukhriani, 2014).



Gambar 2. Instrumentasi UV-Vis (Yanlinastuti dan Fatimah, 2016).

Adapun bagian-bagian dari spektrofotometer UV-Vis yaitu (Mukhriani, 2014):

- a. Sumber cahaya, sumber cahaya yang digunakan pada spektrofotometer UV-Vis yaitu *deutrium lamp* yang memiliki panjang gelombang pada daerah sinar UV (190-350 nm) dan *tungsten filamen* yang memiliki panjang gelombang pada daerah Visibel (350-900 nm). Bagian sumber cahaya terdapat sebuah cermin untuk memantulkan atau mengarahkan cahaya dari sumber ke bagian monokromator.
- b. Monokromator, berfungsi untuk memisahkan cahaya ke berbagai macam warna dengan panjang gelombang yang akan digunakan untuk memperoleh sinar monokromatis. Bagian monokromator terdapat sebuah prisma untuk mengarahkan sinar monokromatis yang diinginkan dari hasil penguraian menggunakan celah.

- c. Kuvet, berfungsi untuk menyimpan sampel dengan tebal 10 mm dan sel yang digunakan berbentuk persegi, tetapi bentuk silinder dapat digunakan. Pada pengukuran di daerah UV menggunakan sel kuarsa, sedangkan pada daerah Visibel menggunakan kuvet kaca.
- d. Detektor, berfungsi untuk memberikan respons terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang dan mempunyai kepekaan yang tinggi. Sinyal yang ditangkap oleh detektor adalah pola interferensi antar dua berkas yang akan diolah detektor sinyal dan menghasilkan grafik yang tertampil pada layar komputer.
- e. *Recorder*, berfungsi untuk menampilkan arus dari detektor dalam satuan yang berhubungan (misalnya daya serap atau presentase transmitansi pada spektrofotometer UV-Vis).

1.2.5 Ekstraksi Kafein

Proses analisis pada suatu sampel dapat dibantu dengan dilakukan proses ekstraksi (Belay et al., 2009). Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu campuran zat dengan cara melarutkan sampel dengan pelarut lain yang menghasilkan dua fasa, fasa rafinat dan fasa ekstrak (Patel et al., 2018). Faktor yang mempengaruhi ekstraksi yaitu kelarutan yang didasarkan pada prinsip "*like dissolve like*", dimana senyawa dengan sifat yang sama akan larut satu sama lain (Chalmers, 2016). Ekstraksi cair-cair merupakan salah satu prinsip ekstraksi. Ekstraksi cair-cair merupakan pemisahan komponen kimia menjadi dua fasa pelarut yang tidak saling bercampur, dimana sebagian komponen larut pada fase 1 dan sebagian larut pada fase 2 hingga menjadi pemisahan sempurna dan terbentuk 2 fasa sesuai dengan tingkat kepolarannya. Menurut Mudigiri dan Jorige (2022) Bahan-bahan organik tidak selalu larut dalam air, oleh karena itu dapat dipisahkan menggunakan corong pisah.

Penambahan basa dalam ekstraksi kafein dari biji kopi dan daun teh, yaitu Na_2CO_3 atau kalsium karbonat (CaCO_3) yang berfungsi untuk memutuskan ikatan kafein dengan senyawa lain contohnya tanin, sehingga kafein akan berada pada suasana basa bebas dan tanin akan diubah menjadi garam fenolik (Zahra et al., 2022). Pemilihan natrium karbonat dibanding kalsium karbonat, karena lebih efektif dan efisien dalam memutuskan ikatan kafein dengan senyawa lain.

Pemisahan kafein dari kopi bubuk dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair. Ekstraksi cair-cair dilakukan dengan corong pisah berdasarkan kepolaran, dimana suatu senyawa akan larut pada pelarut yang kepolarannya sama. Kafein merupakan alkaloid yang bersifat non polar, sehingga memerlukan pelarut non polar yaitu kloroform. Pemilihan kloroform sebagai pelarut dikarenakan kloroform merupakan pelarut organik non polar yang efektif dalam melarutkan kafein, sehingga mampu membuat kafein terekstraksi lebih banyak. Selain itu, dalam kopi terkandung senyawa-senyawa seperti asam klorogenat, polifenol, dan senyawa aromatik yang dapat larut dengan baik dalam kloroform. Hal ini dibuktikan beberapa studi kasus, kloroform menunjukkan persentase ekstraksi (%E) yang lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut lain seperti dietil eter dan n-heksana. (Maramis et al., 2013).

1.3 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. berapa nilai parameter kinerja analitik yang meliputi linearitas, akurasi, presisi, limit deteksi, limit kuantitasi dan ketahanan metode penentuan kadar kafein pada kopi (*Coffea* sp.) menggunakan Spektrofotometri UV-Vis?
2. bagaimana validitas hasil pengukuran dari metode penentuan kadar kafein pada kopi (*Coffea* sp.) menggunakan Spektrofotometri UV-Vis?
3. apakah kadar kafein yang terkandung pada kopi yang diuji memenuhi batas maksimum kafein menurut SNI 01-7152-2006?

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. menentukan nilai parameter kinerja analitik yang meliputi linearitas, akurasi, presisi, limit deteksi, limit kuantitasi dan ketahanan metode penentuan kadar kafein pada kopi (*Coffea* sp.) menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.
2. memperoleh validitas hasil pengukuran dari metode penentuan kadar kafein pada kopi (*Coffea* sp.) menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.
3. mengetahui kadar kafein yang terkandung pada kopi yang diuji memenuhi batas maksimum kafein menurut SNI 01-7152-2006.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai penerapan dan bagaimana cara melakukan pengujian terhadap suatu metode sebelum digunakan di laboratorium.

BAB II METODE

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bubuk kopi robusta; baku standar kafein (Sigma-Aldrich); Na_2CO_3 p.a (Merck); Na_2SO_4 anhidrat p.a (Merck); kloroform p.a (Merck); akuabides; dan kertas saring *Whattman* No.42.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Spektrofotometer UV-Vis *Shimadzu* 1800, neraca analitik Ohaus, buret, statif, labu ukur 50 mL dan 100 mL, gelas piala 50 mL dan 250 mL, spatula, gecep, *bulb*, corong, Erlenmeyer 250 mL, pipet skala 1 mL, pipet volume 10 mL, pipet volume 5 mL, vial, labu semprot, dan *hotplate*.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan Juli sampai November 2024. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Analitik, Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Sampel

Jenis bubuk kopi yang digunakan pada penelitian ini yaitu bubuk kopi robusta yang diambil dari pabrik. Sampel kopi ditimbang sebanyak 5 g dan 4 g Na_2CO_3 , kemudian dimasukkan kedalam gelas piala 250 mL lalu ditambahkan akuabides sebanyak 100 mL lalu dipanaskan di atas *hotplate* selama 10 menit. Lalu disaring dengan kertas saring *Whattman* No.42 ke dalam Erlenmeyer.

2.4.2 Ekstraksi Kafein

Larutan sampel yang diperoleh dimasukkan ke dalam corong pisah lalu dilakukan ekstraksi sebanyak 3 kali dengan masing-masing penambahan 20 mL kloroform dengan waktu ekstraksi masing-masing 5 menit. Semua lapisan fasa organik (fase kloroform) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat, lalu didekantasi kemudian dimasukkan ke dalam vial. Fasa organik hasil ekstraksi tersebut diuapkan dengan *waterbath* sederhana hingga kloroform menguap seluruhnya dan didapatkan ekstrak kafein. Ekstrak kafein dilarutkan dengan akuabides lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL (Elvariyanthi et al., 2020).

2.4.3 Pembuatan Larutan Standar Kafein (Aprilia et al., 2023)

Larutan induk kafein 1000 mg/L. Sebanyak 0,1 g baku kafein ditimbang kemudian dimasukkan kedalam gelas piala lalu dilarutkan dengan akuabides. Selanjutnya, dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan dengan akuabides hingga tanda batas lalu dihomogenkan.

Larutan kafein 100 mg/L. Sebanyak 10 mL larutan induk kafein 1000 mg/L dipipet ke dalam labu ukur 100 mL lalu diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas.

Penentuan panjang gelombang maksimum. Sebanyak 4 mL larutan kafein 100 mg/L dipipet ke dalam labu ukur 50 mL lalu diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas. Pengukuran serapan maksimum pada rentang panjang gelombang 220-350 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan akuabides sebagai blanko.

2.4.4 Kinerja Analitik

Uji Linieritas. Larutan kafein 100 mg/L sebanyak 1; 2; 3; 4; 5; 6; dan 7 mL dipipet lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, selanjutnya diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas kemudian dihomogenkan. Absorbansi deret standar diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 273 nm. Linieritas metode dihitung menggunakan persamaan berikut (Kartika, 2021):

$$y = bx + a \quad (1)$$

dimana, b adalah *slope* dan a adalah *intercept*

Uji Akurasi. Larutan ekstrak kafein dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan dengan akuabides hingga tanda batas. Sebanyak 1 mL larutan kafein 100 mg/L dipipet ke dalam labu ukur 50 mL, lalu diencerkan dengan larutan sampel yang telah ditambahkan dengan akuabides hingga tanda batas. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 273 nm dengan dilakukan pengulangan sebanyak 7 kali. Akurasi metode pada penelitian ini dinyatakan dalam *%recovery* yang dapat dihitung menggunakan persamaan berikut (Ayuni, 2022):

$$\%R = \frac{CF - CA}{CA} \times 100\% \quad (2)$$

dimana: CF adalah konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran (mg/L), CA adalah konsentrasi sampel sebenarnya (mg/L), dan C'A adalah konsentrasi analit yang ditambahkan (mg/L).

Uji Presisi. Larutan ekstrak kafein dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan akuabides hingga tanda batas. Absorbansi larutan kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 273 nm dengan dilakukan pengulangan sebanyak 7 kali. Kadar kafein dalam sampel dapat dihitung menggunakan rumus berikut (Nia et al., 2023)

$$y = bx + a \quad (3)$$

dimana, b adalah *slope* dan a adalah *intercept*

Presi dapat ditentukan dengan menghitung persen *coefisient variation* (%CV) menggunakan persamaan (Hayon et al., 2021):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (4)$$

$$\%CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (5)$$

dimana: SD adalah standar deviasi, x_i adalah nilai konsentrasi hasil yang diperoleh, dan n adalah jumlah pengulangan.

Apabila %CV yang diperoleh > 2%, maka presisi dapat dihitung dengan menggunakan perhitungan CV Horwitz (*Coefficient Variance Horwitz*) dengan persamaan berikut (Hayon et al., 2021):

$$\%CV \text{ Horwitz} = 2^{1-0,5 \log C} \quad (6)$$

dimana: C adalah rata-rata konsentrasi larutan standar dikali 10^{-6} .

Uji Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi. Larutan kafein 100 mg/L dipipet masing-masing sebanyak 2 mL lalu dimasukkan kedalam 7 labu ukur 50 mL, selanjutnya, diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas kemudian dihomogenkan. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 273 nm. Nilai LOD dan LOQ ditentukan menggunakan persamaan (Citra, 2019):

$$Sy/x = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (7)$$

$$LOD = \frac{3 \times Sy/x}{s} \quad (8)$$

$$LOQ = \frac{10 \times Sy/x}{s} \quad (9)$$

dimana: Sy/x adalah simpangan baku residual, s adalah *slope*, x adalah konsentrasi hasil pengukuran, \bar{x} adalah rata-rata konsentrasi hasil pengukuran, dan n jumlah pengulangan pengukuran.

Uji Ketahanan (*Robustness*). Sampel kopi ditimbang sebanyak 5 g dan 4 g Na_2CO_3 , kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala 250 mL lalu ditambahkan akuabides sebanyak 100 mL lalu dipanaskan di atas *hotplate* selama 20 menit. Lalu disaring dengan kertas *Whatman* No.42 ke dalam Erlenmeyer. Selanjutnya, Larutan sampel yang diperoleh dimasukkan ke dalam corong pisah lalu dilakukan ekstraksi sebanyak 3 kali dengan masing-masing penambahan 20 mL kloroform dengan waktu ekstraksi masing-masing 10 menit. Semua lapisan fasa organik (fase kloroform) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat, lalu didekantasi kemudian dimasukkan ke dalam vial. Fasa organik hasil ekstraksi tersebut diuapkan dengan *waterbath* sederhana hingga kloroform menguap seluruhnya dan didapatkan ekstrak

kafein. Ekstrak kafein dilarutkan dengan akuabides lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL. Larutan ekstrak kafein dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan akuabides hingga tanda batas. Absorbansi larutan kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 273 nm dengan dilakukan pengulangan sebanyak 7 kali. Ketahanan metode ditentukan dengan melakukan uji statistik yaitu uji T dan uji F.