

Validasi Metode dan Penetapan Kadar Kafein Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

Validation of the Method and Determination of Caffeine Levels Using UV-Vis Spectrophotometry

Nia Fevniaty Rupa^{1,*}, Sabaniah Indjar Gama², Islamudin Ahmad

²Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Kefarmasian “Farmaka Tropis”,
Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur, Indonesia

*Email Korespondensi: niarupa29@gmail.com

Abstrak

Kafein merupakan salah satu alkaloid yang terkandung dalam kopi. Kafein pada kopi memiliki efek farmakologis yang bermanfaat secara klinis, seperti merangsang sistem saraf pusat, menghilangkan rasa lelah dan mengantuk. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui validasi metode analisis pada penetapan kadar kafein dalam kopi robusta, dimana sampel yang digunakan adalah kopi yang berasal dari Kalimantan dan Sulawesi. Metode analisis yang digunakan untuk menetapkan kadar kafein dalam kopi adalah spektrofotometri UV-Vis. Parameter pada validasi metode yaitu linearitas, LOD dan LOQ, presisi, dan akurasi. Pengujian validasi yang dilakukan menunjukkan hasil yang linier dimana nilai r^2 adalah 0,9927. Nilai limit deteksi (LOD) yang diperoleh adalah 25,9344 dan nilai limit kuantitas (LOQ) yang diperoleh adalah 78,5893. Hasil uji akurasi dinyatakan dalam %recovery yaitu 106,7%. Pada tahap akhir dilakukan uji presisi dimana hasil nilai RSD yang diperoleh adalah 1,5937%. Pada penetapan kadar kafein diperoleh kadar kafein untuk kopi Sulawesi sebesar 0,466 mg/g dan untuk kopi Kalimantan sebesar 0,591 mg/g.

Kata Kunci: Kafein, Spektrofotometer UV-Vis, Validasi Metode

Abstract

Caffeine is one of the alkaloids contained in coffee. Caffeine in coffee has clinically useful pharmacological effects, such as stimulating the central nervous system, relieving fatigue and drowsiness. This study aims to determine the validation of the analytical method for determining caffeine content in robusta coffee, where the sample used is coffee from Kalimantan and Sulawesi. The analytical method used to determine caffeine levels in coffee is UV-Vis spectrophotometry. Parameters in method validation are linearity, LOD and LOQ, precision, and accuracy. The validation test performed showed linear results where the value of r^2 was 0,9927. The limit value of detection (LOD) obtained is

25,9344 and the value limit quantity (LOQ) obtained is 78,5893. The results of the accuracy test are expressed in %recovery, which is 106,7%. In the final stage a precision test was carried out where the RSD value obtained was 1,5937%. In determining the caffeine content, the caffeine content for Sulawesi coffee was 0,466 mg/g and for Kalimantan coffee was 0,591 mg/g.

Keywords: Caffeine, Spektrophotometry UV-Vis, Method validation

DOI: <https://doi.org/10.25026/mpc.v18i1.713>



Copyright (c) 2023, Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences (Proc. Mul. Pharm. Conf.). Published by Faculty of Pharmacy, University of Mulawarman, Samarinda, Indonesia. This is an Open Access article under the CC-BY-NC License.

Cara Sitasi:

Rupa, N. F., Gama, S. I., Ahmad, I., 2023. Validasi Metode dan Penetapan Kadar Kafein Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. *Proc. Mul. Pharm. Conf.* **18**(1). 109-115.
DOI: <https://doi.org/10.25026/mpc.v18i1.713>

1 Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu Negara dengan konsumsi kopi terbesar di dunia. Mengonsumsi kopi sudah menjadi bagian penting dari gaya hidup sebagian orang karena dinilai mampu menghilangkan kepenatan setelah melakukan aktivitas harian. Kopi merupakan minuman yang memiliki kandungan senyawa organik alkaloid. Kafein yang terdapat dalam kopi merupakan golongan alkaloid yang terdapat secara alami pada daun teh (*Camelia sinensis*), biji kopi (*Coffea arabica*) dan biji coklat (*Theobroma cacao*). Kafein yang terdapat dalam kopi dapat memberikan efek farmakologis dimana dapat menstimulasi susunan saraf pusat, menghilangkan rasa letih, memperbaiki kerja otak, relaksasi otot polos bronkus dan stimulasi otot jantung [1]. Namun, ketika kopi dikonsumsi secara berlebihan dapat memberikan efek negatif bagi tubuh yaitu menimbulkan kecanduan, gugup, gelisah, tremor, insomnia, hipertensi, mual dan kejang [2].

Spektrofotometer UV-Vis merupakan metode yang paling sering digunakan dalam analisis kimia maupun biologi, sedangkan alat spektrofotometer UV-Vis merupakan alat yang digunakan sebagai instrument analisis. Metode

spektrofotometri merupakan metode yang sering digunakan dalam suatu penelitian karena memiliki kelebihan yaitu analisis lebih sederhana, cepat, dan ekonomis [3]. Validasi metode analisis merupakan proses pembuktian atau konfirmasi pengujian yang objektif di Laboratorium dan bahwa metode yang digunakan telah memenuhi persyaratan yang ditetapkan untuk penggunaannya [4].

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian ini untuk mengetahui bahwa metode spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk analisis penetapan kadar kafein pada kopi robusta yang berasal dari Kalimantan dan Sulawesi.

2 Metode Penelitian

2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, corong pisah, gelas kimia, kaca arloji, kertas saring, kuver, pipet volum, labu ukur, mangkuk, spatel logam, Spektrofotometer UV-Vis Double Beam, Timbangan analitik.

2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kopi robusta, standar kafein, aquades, dan kloroform.

2.3 Pembuatan Larutan Baku Standar

Sebanyak 0,1 g standar kafein ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dengan aquades. Lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok homogen, kemudian diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Dilakukan pengenceran 100 ppm dengan cara dipipet larutan sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan aquades sampai tanda batas dan di homogenkan.

2.4 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang serapan maksimum dilakukan dengan cara dipipet 1 mL larutan induk baku dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu dilarutkan dengan aquades sampai tanda batas. Kemudian diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 270-300 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

2.5 Pembuatan Kurva Kalibrasi (Linearitas)

Kurva kalibrasi dilakukan dengan membuat serangkaian seri konsentrasi dengan memipet masing-masing larutan sebanyak 0,6 mL, 0,8 mL, 1 mL, 1,2 mL, dan 1,4 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu ditambahkan dengan aquades sampai tanda batas dan dihomogenkan hingga diperoleh konsentrasi 6, 8, 10, 12, dan 14 ppm. Kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang serapan maksimum 277 nm. Kemudian dianalisis dengan regresi linear. Hasil persamaan regresi linear kemudian dimasukkan ke dalam rumus perhitungan koefisien korelasi (r) yang akan menunjukkan nilai linearitasnya.

2.6 Penentuan LOD dan LOQ

Nilai LOD dan LOQ diperoleh setelah pembuatan kurva kalibrasi standar kafein dan diperoleh persamaan garis regresi. Selanjutnya LOD dan LOQ dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi.

2.7 Penentuan Presisi

Larutan standar diambil sebanyak 1 mL, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas. Lalu larutan diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan dan dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali.

2.8 Penentuan Akurasi

Larutan standar diambil sebanyak 1 mL, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas. Lalu larutan diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan dan dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali.

2.9 Penetapan Kadar Kafein

Sampel kopi ditimbang sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam gelas kimia. Kemudian dilarutkan dengan aquades panas sebanyak 100 mL, lalu disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang didapatkan ditambahkan dengan CaCO_3 sebanyak 2 gram. Lalu dimasukkan ke dalam corong pisah ditambahkan dengan 25 mL kloroform dan digojok. Kemudian ambil lapisan kloroform dan diuapkan menggunakan rotary evaporator sehingga didapatkan ekstrak kafein. Ekstrak kafein yang didapatkan dilarutkan dengan aquades selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas. Kemudian dilakukan pengenceran dengan cara dipipet 2 mL larutan tersebut ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas. Lalu ditentukan kadarnya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 277 nm.

3 Hasil dan Pembahasan

3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk memberikan kepekaan sampel yang mengandung kafein dengan maksimal. Adapun pelarut yang digunakan pada penetapan Panjang gelombang maksimum adalah aquades, selain digunakan sebagai pelarut aquades juga digunakan sebagai blanko untuk mengkalibrasi spektrofotometri UV-Vis dengan tujuan meminimalisir kesalahan

penggunaan alat dalam penetapan Panjang gelombang maksimum. Pengumpulan data panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dimana larutan standar kafein dengan konsentrasi 10 ppm diukur pada panjang gelombang 270-300 nm.

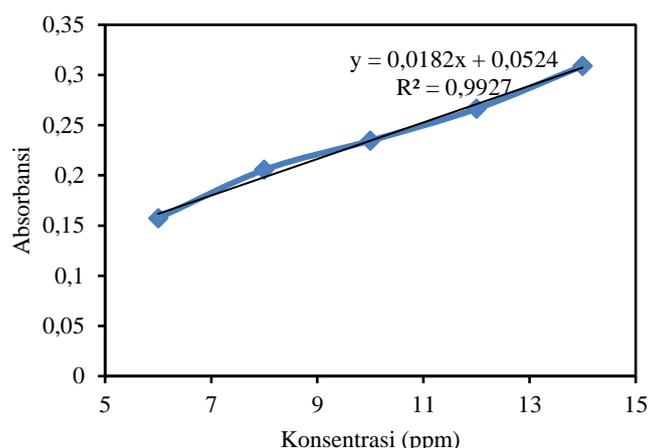
Tabel 1. Panjang Gelombang

Panjang Gelombang	Absorbansi
270 nm	0,901
277 nm	0,902
284 nm	0,845
291 nm	0,409
300 nm	0,004

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis. Tujuan dilakukannya penentuan panjang gelombang maksimum adalah agar sensitivitas yang dimiliki juga maksimum [5]. Adapun pelarut yang digunakan pada penetapan panjang gelombang maksimum adalah aquades, selain digunakan sebagai pelarut aquades juga digunakan sebagai blanko untuk mengkalibrasi spektrofotometri UV-Vis dengan tujuan meminimalisir kesalahan penggunaan alat dalam penetapan panjang gelombang maksimum. Larutan standar kafein dengan konsentrasi 10 ppm diukur pada panjang gelombang 270-300 nm. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dari larutan baku kafein dapat dilihat pada Tabel 1. Sesuai hasil pengukuran serapan tertinggi yang diperoleh pada penelitian ini yaitu pada panjang gelombang 277 nm dengan nilai absorbansi 0,902.

3.2 Linearitas

Linearitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk memperoleh hasil pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit yang terdapat pada sampel pada kisaran konsentrasi tertentu. Linearitas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data analisis yang diperoleh akan diproses untuk menentukan nilai kemiringan (slope), intersep dan koefisien korelasi [6]. Dari hasil penelitian diperoleh kurva linearitas standar kafein seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1 Kurva Linearitas Standar Kafein

Uji linearitas bertujuan untuk mengetahui seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dan konsentrasi (x). Uji linearitas ditetapkan dengan seri larutan baku yang terdiri dari minimal lima konsentrasi berbeda. Dalam uji linearitas dilakukan pengukuran kurva kalibrasi dengan membuat larutan menjadi lima seri konsentrasi yaitu 6, 8, 10, 12, dan 14 ppm selanjutnya diukur serapan pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Linearitas ditentukan dengan cara mengolah data antara konsentrasi (x) dengan absorbansi (y) yang diperoleh dari kurva kalibrasi menggunakan persamaan regresi linear, sehingga diperoleh nilai koefisien korelasi. Didapatkan hasil persamaan regresi yaitu $y = 0,0182x + 0,0524$ dan diperoleh nilai koefisien korelasi (r^2) 0,9927. Linearitas dapat ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r). Nilai koefisien korelasi yang didapatkan mendekati persyaratan yang ditetapkan, dimana nilai koefisien korelasi yang baik adalah $0,99 \leq r \leq [6]$.

3.3 Penentuan LOD & LOQ

Limit Deteksi (LOD) didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, namun tidak perlu ditentukan kuantifikasinya. Limit deteksi (LOD) bertujuan untuk mengetahui jumlah analit terendah yang masih bisa dideteksi namun tidak perlu dapat terukur.

Tabel 1 Hasil validasi LOD & LOQ

X	Y	y1	(y-y1)	(y-y1) ²
6	0,1573	0,16166	-0,00436	0,00001901
8	0,2055	0,19806	0,00744	0,00005535
10	0,2346	0,23446	0,00014	0,00000002
12	0,2663	0,27086	-0,00456	0,00002079
14	0,309	0,30726	0,00174	0,00000303
Σ				0,0000982

Dalam penentuan limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ) diperoleh melalui perhitungan regresi linear pada kurva kalibrasi. Didapatkan persamaan garis regresi linear $y = 0,0182x + 0,0524$. Dari persamaan garis regresi dari Table 1 diatas, kemudian dihitung nilai LOD dan LOQ dengan rumus yang telah ditentukan. Dimana perhitungan nilai limit deteksi dengan rumus $LOD = 3,3(Sb/b)$ dan limit kuantitasi dengan rumus $LOQ = 10,5(Sb/b)$ dimana Sb

merupakan simpangan baku dari kurva kalibrasi dan b adalah slope kemiringan dari kurva kalibrasi. Dari hasil perhitungan tersebut didapatkan nilai LOD 25,9344 ppm dan LOQ 78,5893 ppm. Nilai LOD dan LOQ yang diperoleh menunjukkan bahwa metode ini dapat digunakan untuk menganalisis kadar kafein menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.4 Penentuan Akurasi

Akurasi merupakan ukuran analisis yang menunjukkan kedekatan hasil uji yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Akurasi juga dinyatakan sebagai hasil perolehan kembali (*%recovery*) (Tabel 1). Akurasi ditentukan oleh analisis berulang dari sampel yang mengandung analit dalam jumlah yang diketahui [4].

Tabel 2 Validasi Akurasi Standar Kafein

Konsentrasi	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata	Konsentrasi yang diperoleh	Recovery (%)
10 ppm	I	0,246	0,2466	10,670	106,7
	II	0,248			
	III	0,247			
	IV	0,258			
	V	0,249			
	VI	0,258			
	VII	0,245			
	VIII	0,248			
	IX	0,254			
	X	0,213			

Akurasi bertujuan untuk menunjukkan derajat kedekatan kadar analit yang sebenarnya dengan hasil analisis. Akurasi diukur berdasarkan persen perolehan kembali (*%recovery*). Uji akurasi dilakukan dengan mengambil data absorbansi yang dilakukan sebanyak 10 kali pengulangan. Kemudian dihitung nilai perolehan kembali (*%recovery*) menggunakan rumus perhitungan yang ditentukan. Hasil *%recovery* yang diperoleh adalah sebesar 106,7%, jika hasil persen perolehan kembali berada pada rentang 80-120% maka dapat dinyatakan bahwa *%recovery* memenuhi persyaratan [4]. Hal tersebut menjelaskan bahwa *% recovery* yang dihasilkan berada pada batas yang dipersyaratkan sehingga dapat dinyatakan bahwa metode spektrofotometri UV-Vis memiliki akurasi yang baik untuk pengujian kadar kafein dalam kopi.

3.5 Penentuan Presisi

Presisi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kesamaan dari hasil uji individual, dengan mengukur simpangan baku atau simpangan relative [4]. Dengan kata lain presisi merupakan metode validasi yang bertujuan untuk mengetahui kedekatan hasil analisis apabila dilakukan analisis yang dilakukan secara berulang. Presisi dinyatakan dalam persen simpangan baku relatif (RSD) atau persen koefisien variasi. Berikut merupakan hasil dari uji presisi:

Uji presisi atau penentuan ketelitian merupakan keterulangan hasil yang dapat ditentukan melalui parameter simpangan baku relatif (RSD). Pada penelitian diperoleh nilai simpangan baku relatif (RSD) yaitu 1,593% (Tabel 4). Presisi dikatakann baik apabila nilai *%RSD* kurang dari 2% [7]. Sehingga dapat

dikatakan bahwa harga ketelitian metode spektrofotometri UV-Vis adalah baik karena telah memenuhi persyaratan. Hal ini menandakan bahwa metode analisis yang digunakan memiliki presisi yang baik untuk pengujian kadar kafein pada kopi.

Tabel 3 Validasi Metode Presisi

Replikasi	Absorbansi	Rata-rata	SD	RSD (%)
I	0,206	0,2059	0,00328	1,593
II	0,203			
III	0,209			
IV	0,203			
V	0,210			
VI	0,200			
VII	0,208			
VIII	0,204			
IX	0,207			
X	0,209			

3.6 Penetapan Kadar Kafein

Kopi merupakan salah satu minuman yang banyak digemari masyarakat, penikmat kopi biasanya minum kopi 3-4 cangkir setiap hari. Hal ini menyebabkan seseorang dapat ketergantungan terhadap minuman kopi. Ketergantungan tersebut disebabkan oleh kandungan kafein dalam kopi. Kafein adalah salah satu jenis alkaloid yang banyak terdapat dalam biji kopi, daun teh, dan biji coklat. Kafein memiliki efek farmakologis yang bermanfaat secara klinis, seperti menstimulasi susunan syaraf pusat, relaksasi otot polos terutama otot polos bronkus dan stimulasi otot jantung [1]. Berdasarkan efek farmakologis tersebut, kafein ditambahkan dalam jumlah tertentu ke minuman. Efek berlebihan (*over dosis*) mengkonsumsi kafein dapat menyebabkan gugup, gelisah, tremor, insomnia, hipertensi, mual. Tabel 5 merupakan hasil dari data kenentuan kadar kafein pada penelitian ini

Tabel 4 Kadar Kafein dalam Sampel Kopi

Sampel	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata	Jumlah Sampel	Konsentrasi	Kadar
Kopi Sulawesi	I	0,138	0,1373	1 g	4,6648 ppm	0,466 mg/g
	II	0,136				
	III	0,138				
Kopi Kalimantan	I	0,162	0,1600	1 g	5,912 ppm	0,591 mg/g
	II	0,160				
	III	0,158				

Kopi robusta merupakan salah satu jenis kopi yang populer dikonsumsi oleh masyarakat. Kopi robusta memiliki citarasa lebih pahit dibandingkan jenis kopi lainnya. Pada proses ekstraksi kafein dalam kopi robusta digunakan CaCO_3 yang bertujuan untuk memutuskan ikatan kafein dengan senyawa lain, sehingga kafein yang dihasilkan dalam basa bebas. Kemudian pemilihan pelarut kloroform dikarenakan kafein mudah larut dalam kloroform [8] dan kafein larut dalam 6 bagian kloroform.

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kadar kafein untuk kopi robusta yang berasal dari Sulawesi sebesar 0,466 mg/g dan Kalimantan sebesar 0,591 mg/g. Perbedaan kadar kafein dalam kedua sampel berbeda dapat disebabkan karena perbedaan tanah tempat penanaman, suhu dan cuaca, serta proses penyimpanan dan perlakuan.

Berdasarkan FDA (*Food Drug Administration*) dosis kafein yang diizinkan 100- 200mg/hari, sedangkan menurut SNI 01- 7152-2006 batas maksimum kafein dalam makanan dan minuman adalah 150 mg/hari dan 50 mg/sajian.

4 Kesimpulan

1. Berdasarkan pengujian validasi yang dilakukan menunjukkan hasil yang linear ($r = 0,992653$), batas deteksi ($\text{LOD} = 25,9344$) batas kuantitatif ($\text{LOQ} = 78,5893$), akurasi ($\text{Recovery} = 106,7\%$), dan presisi ($\text{RSD} = 1,593\%$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa metode spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk analisis penetapan kadar kafein.
2. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kadar kafein untuk kopi robusta yang berasal dari Sulawesi sebesar 0,466 mg/g

dan Kalimantan sebesar 0,591 mg/g. Menurut FDA (*Food Drug Administration*) dosis kafein yang diizinkan 100-200mg/hari, sedangkan menurut SNI 01-7152-2006 batas maksimum kafein dalam makanan dan minuman adalah 150 mg/hari dan 50 mg/sajian.

5 Pernyataan

5.1 Penyanggah Dana

Penelitian ini tidak mendapatkan pendanaan dari sumber manapun.

5.2 Kontribusi Penulis

Semua penulis berkontribusi dalam penulisan artikel ini.

5.3 Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan.

6 Daftar Pustaka

[1] Coffeefag. 2001. *Frequently Asked Questions about Caffeine*. Diakses 26 Maret 2013.

- [2] Arawangga, Aryanu.2016. Analisis Kandungan Kafein Pada Kopi Di Desa Seasot Narmada Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Kimia (10)1*.
- [3] Susanti H., dkk. 2019. Perbandingan Metode Spektrofotometri UV dan HPLC Pada Penetapan Kadar Kafein Dalam Kopi. *Majalah Farmasetika 4(1)*.
- [4] Harmita, 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian, 1(3), 117-135*.
- [5] Pratiwi, R.A., dan Nandiyanto, A. B. D. 2021. How to Read and Interpret UV-Vis Spectrophotometric Result in Determining the Structure of Chemical Compounds. *Indonesian Journal of Educational Research and Technology, 2(1), 1-20*.
- [6] Ganjar, L.G., & Rohman, A. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- [7] Riyanto, Ph.D. 2014. *Validasi Dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai Dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian Dan Kalibrasi*. Edisi 1. Deepublish: Yogyakarta.
- [8] Depkes RI. 1995. *Farmakope Indonesia (VI)*. Jakarta: Kemenkes RI