



**PENETAPAN KADAR KAFEIN PADA BERBAGAI JENIS MINUMAN
KOPI MENGGUNAKAN METODE SKANOMETRI**

SKRIPSI

RAHMA RISKA PANIDA

192210101089

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2023



**PENETAPAN KADAR KAFEIN PADA BERBAGAI JENIS MINUMAN
KOPI MENGGUNAKAN METODE SKANOMETRI**

SKRIPSI

diajukan guna melangkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

Rahma Riska Panida

192210101089

**BAGIAN BIOLOGI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2023

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Tuhan Yesus Kristus yang telah memberikan berkat dan bimbinganNya selama penelitian berlangsung dan penulisan skripsi;
2. Kedua orang tuaku, Joni Samsul Hadi dan Rosa Da Lima Herlinda Bere yang senantiasa memberikan kasih sayang, semangat dan dukungan dalam menyelesaikan skripsi;
3. Kedua kakak tersayang, Topan Prasta Panida dan Bunga Artasastya Panida yang memberikan dukungan dan semangat;
4. Dosen pembimbing Bapak Drs. apt. Moch. Amrun Hidayat, S.Si., M.Farm dan Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D yang telah membimbing saya hingga bisa menyelesaikan skripsi;
5. Dosen penguji Ibu apt. Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm dan Ibu Dr. apt. Siti Muslichah, S.Si, M.Sc atas saran dan masukannya dalam ujian seminar proposal dan sidang skripsi;
6. Semua orang yang tidak lelah bertanya *kapan skripsinya selesai*, kupersembahkan skripsi ini agar kalian bisa berhenti bertanya dan focus pada kehidupan kalian masing-masing;
7. Yang terakhir, terima kasih pada diriku yang sudah percaya dan tidak menyerah dalam mengerjakan skripsi. Kamu hebat.

MOTO

Janganlah hendaknya kamu kuatir tentang apapun juga, tetapi nyatakanlah dalam segala hal keinginanmu kepada Allah dalam doa dan permohonan dengan ucapan syukur.¹

Bersukacitalah senantiasa. Tetaplah berdoa. Mengucap syukurlah dalam segala hal, sebab itulah yang dikehendaki Allah di dalam Kristus Yesus bagi kamu.²

¹ Filipi 4: 6

² 1 Tesalonika 5: 16-18

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rahma Riska Panida

NIM : 192210101089

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Penetapan Kadar Kafein Pada Berbagai Minuman Kopi Menggunakan Metode Skanometri” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 Juli 2023

Yang menyatakan,

Rahma Riska Panida

NIM. 192210101089

SKRIPSI

PENETAPAN KADAR KAFEIN PADA BERBAGAI JENIS MINUMAN KOPI MENGGUNAKAN METODE SKANOMETRI

Oleh:

Rahma Riska Panida

NIM 192210101089

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. apt. Moch. Amrun Hidayat, S.Si., M.Farm

Dosen Pembimbing Anggota : Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Penetapan Kadar Kafein Pada Berbagai Jenis Minuman Kopi Menggunakan Metode Skanometri” karya Rahma Riska Panida telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Kamis, 20 Juli 2023

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,



Dr. apt. Moch. Amrun H., S.Si., M.Farm
NIP. 197801262001121004

Dosen Pembimbing Anggota,



Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D
NIP. 196902011994031002

Tim Penguji

Dosen Penguji Utama,



apt. Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm
NIP. 198407122008122002

Dosen Penguji Anggota,



Dr. apt. Siti Muslichah, S.Si., M.Sc
NIP. 197305132005012001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



Dr. apt. Nur, S.Si., M.Si.
NIP. 196904122001121007

RINGKASAN

Penetapan Kadar Kafein Pada Berbagai Jenis Minuman Kopi Menggunakan Metode Skanometri: Rahma Riska Panida: 192210101089; 2023; 71 halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Kopi merupakan salah satu komoditi yang penting dalam perekonomian Indonesia dan banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari seperti minuman, makanan bahkan obat-obatan. Selain karena rasa dan aromanya yang nikmat, kopi banyak digemari karena memiliki efek untuk menghilangkan kantuk. Efek ini disebabkan oleh kandungan senyawa kafein pada kopi. Kafein merupakan sebuah senyawa alami yang berasal dari kelompok xanthin dan dapat berperan sebagai stimulan sistem saraf pusat, meningkatkan denyut jantung dan meningkatkan aktivitas otak. Kafein juga berperan sebagai stimulan psikoaktif dan diuretik ringan, serta secara medis dapat mengurangi kelelahan fisik dan mengembalikan kewaspadaan saat mengantuk. Akan tetapi konsumsi kafein dalam jumlah tinggi dapat menimbulkan efek samping berupa kecemasan, kegelisahan, insomnia, kelelahan, jantung berdebar, gangguan gastrointestinal dan peningkatan tekanan darah. Sehingga perlu dilakukan penetapan kadar kafein dalam sampel olahan kopi yang berbeda untuk memastikan bahwa kadar kafein yang terkandung di dalamnya sudah sesuai dengan regulasinya. Terdapat banyak metode yang telah digunakan untuk mendeteksi kafein tetapi beberapa metode tersebut memiliki kelemahan. Untuk mengatasinya, perlu dilakukan pengembangan metode penetapan kadar kafein. Salah satu metode yang dapat dikembangkan untuk penetapan kadar kafein adalah metode kolorimetri.

Metode kolorimetri adalah sebuah metode pengujian yang memanfaatkan perubahan warna untuk menentukan keberadaan analit secara kualitatif atau semikuantitatif. Pada penelitian ini, kafein akan dideteksi menggunakan reagen natrium periodat, asam asetat dan 3-metil-2-benzotiazolinon (MBTH) pada lempeng sumuran mikro. Pengukuran kafein dilakukan dengan mengukur perubahan warna yang dihasilkan (*mean blue*) menggunakan *scanner* komersial dan hasilnya dianalisis menggunakan program *ImageJ*.

Karakterisasi metode analisis yang dilakukan pada penelitian ini adalah waktu respon 20 menit, linearitas dengan membuat kurva baku menggunakan standar kafein terhadap rentang konsentrasi 50 hingga 900 yang memiliki nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9996 dalam persamaan regresi $y = 0,003x + 71,793$. Nilai batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) yang dihasilkan sebesar masing-masing 36,4773 ppm dan 110,5374 ppm. Nilai presisi dilihat menggunakan nilai RSD dengan syarat di bawah 5,3%, hasil presisi standar 500 ppm adalah 1,157% dan pada sampel sebesar 1,197%. Untuk nilai akurasi, didapatkan nilai akurasi standar 500 ppm dan sampel masing-masing 99,914% dan 98,670%, dimana syarat persentase *recovery* adalah 90-107%. Pada karakterisasi interferensi, metode akan terganggu dengan adanya asam tanat dengan perbandingan 1:4 dan asam klorogenat dengan perbandingan 1:2, 1:4 dan 1:8 karena menghasilkan persentase interferensi lebih 5%. Reagen yang digunakan pada penelitian ini tidak dapat digunakan setelah 180 menit jika disimpan pada suhu ruang (25°C) dan setelah 2 hari jika disimpan pada suhu lemari es (4°C). Setelah itu, apabila dibandingkan menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis, metode ini tidak memberikan perbedaan yang signifikan ($\alpha > 0,05$). Sehingga dapat ditarik kesimpulan, bahwa metode skanometri dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk mendeteksi kafein.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas berkah dan bimbinganNya sehingga skripsi yang berjudul “Penetapan Kadar Kafein Pada Berbagai Minuman Kopi Menggunakan Metode Skanometri” telah terselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Orang tua tersayang dan terkasih, Joni Samsul Hadi dan Rosa Da Lima Herlinda Bere atas bimbingan serta doa yang telah diberikan hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi.
2. Saudaraku tersayang, Topan Prasta Panida dan Bunga Artasastya Panida atas dukungan moral dan material selama penelitian dan penulisan naskah skripsi.
3. Dosen pembimbing Bapak Drs. apt. Moch. Amrun Hidayat, S.Si., M.Farm dan Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D yang telah membimbing saya hingga bisa menyelesaikan skripsi.
4. Dosen penguji Ibu apt. Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm dan Ibu Dr. apt. Siti Muslichah, S.Si, M.Sc atas saran dan masukannya dalam ujian seminar proposal dan sidang skripsi.
5. Seluruh staff civitas akademika Fakultas Farmasi Universitas Jember dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.
6. Mbak Parka dan Bu Widi selaku laboran biologi yang telah membantu kami agar dapat menyelesaikan penelitian kami dan lulus dengan nilai memuaskan.
7. Yunita, Dyah, Jeni, Yasmin, Sasa, Oca, Mbak Karin, Izza, Sindi, Barnas serta teman-teman skripsi di laboratorium biologi farmasi.
8. Cynthia Arinda Mayanagsari, Nurul Karimah Ali, Lydya Utari, dan Sandra Dewi Puspitasari yang sudah selalu mendengarkan keluh kesah dan menyemangati saya untuk menyelesaikan skripsi.

9. Lita, Indy, Erik, dan Gysta yang selalu menyemangati melalui pengumuman jadwal seminar proposal dan siding kalian.
10. Mas Kyo dan Om Nanaken yang sudah berpulang, saya sudah menyelesaikan kewajiban saya di jenjang perkuliahan ini. Jangan khawatir lagi ya.
11. Caelus, Dan Heng, March 7th, Mama Himeko, Papa Welt, dan Pom-Pom dari Astral Express yang sudah menemani selama penulisan dan penelitian.
12. Ci Serval, Ci Pela, Ci Bronya, Kak Seele, Kak Natasha, Gepard, Hook dan The Moles dan semua teman-teman dari Belobog yang sudah menemani selama penulisan dan penelitian.
13. Pak Jendral Jingyuan beserta anaknya Yanqing, Mbak Qingque yang hobi main game saat kerja, Mbak Fu Xuan, Mbak Yukong, Mbak Tingyun, Om Luocho dari Xianzhou yang sudah menemani selama penulisan dan penelitian.
14. Mama Kafka, Om Blade, dan Silver Wolf dari *Stellaron Hunter* yang sudah menemani selama penulisan dan penelitian.
15. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas segala bantuan dan kerjasamanya.
16. Dan yang terakhir, terima kasih kepada diri saya sendiri yang tidak menyerah di tengah jalan dan tetap berusaha menyelesaikan skripsi ini.

Penulis akan menerima kritik dan saran dari semua pihak yang terkait demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi pembaca dalam mengembangkan ilmu pengetahuan untuk semua orang.

Jember, 20 Juli 2023

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|------------------------------|-----|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | ii |
| HALAMAN MOTO | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iv |
| HALAMAN PEMBIMBINGAN | v |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | vi |
| RINGKASAN | vii |
| PRAKATA..... | ix |
| DAFTAR ISI..... | xi |
| DAFTAR TABEL..... | xiv |
| DAFTAR GAMBAR | xv |
| BAB I PENDAHULUAN..... | xvi |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 4 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 4 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 5 |
| 2.1 Kopi (Coffea sp.)..... | 5 |
| 2.1.1 Taksonomi Kopi..... | 5 |
| 2.1.2 Morfologi Kopi | 6 |
| 2.1.3 Jenis kopi..... | 7 |
| 2.1.4 Kandungan Senyawa..... | 8 |
| 2.2 Kafein | 9 |
| 2.3 Metode Skanometri | 12 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 2.4 | Karakteristik Metode Analisis | 15 |
| BAB III METODOLOGI PENELITIAN..... | | 20 |
| 3.1 | Jenis Penelitian | 20 |
| 3.2 | Waktu dan Tempat Penelitian | 20 |
| 3.3 | Rancangan Penelitian | 20 |
| 3.3.1 | Definisi Operasional..... | 20 |
| 3.3.2 | Diagram Alur Penelitian | 21 |
| 3.4 | Alat dan Bahan | 22 |
| 3.4.1 | Alat..... | 22 |
| 3.4.2 | Bahan..... | 22 |
| 3.5 | Prosedur Penelitian..... | 22 |
| 3.5.1 | Preparasi Larutan Induk Standar Kafein | 22 |
| 3.5.2 | Preparasi Larutan Standar Kafein | 23 |
| 3.5.3 | Preparasi Larutan Reagen Natrium Periodate | 23 |
| 3.5.4 | Preparasi Larutan Reagen MBTH..... | 23 |
| 3.5.5 | Preparasi Larutan Reagen Asam Asetat | 23 |
| 3.6 | Optimasi Reagen dan Konsentrasi Reagen dan Kafein | 24 |
| 3.7 | Pembuatan Kurva Baku Kafein | 25 |
| 3.8 | Penentuan Intensitas Warna | 25 |
| 3.9 | Karakteristik Sensor Kimia | 25 |
| 3.10 | Preparasi Sampel | 28 |
| 3.11 | Aplikasi Metode Penetapan Kadar Kafein | 28 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | | 30 |
| 4.1 | Optimasi Metode Analisis | 30 |
| 4.1.1 | Optimasi Volume Pada Lempeng Sumuran Mikro..... | 30 |
| 4.1.2 | Optimasi Konsentrasi Reagen NP, MBTH dan Asam Asetat | 31 |
| 4.1.3 | Optimasi Suhu Pemanasan..... | 32 |

| | | |
|---------------------------------|--|----|
| 4.1.4 | Optimasi Pembacaan Intensitas Warna..... | 34 |
| 4.2 | Karakterisasi Metode Analisis..... | 36 |
| 4.2.1 | Waktu Respon | 36 |
| 4.2.2 | Linearitas..... | 37 |
| 4.2.3 | Sensitivitas | 37 |
| 4.2.4 | Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi (<i>LOD</i> dan <i>LOQ</i>)..... | 38 |
| 4.2.5 | Presisi | 39 |
| 4.2.6 | Akurasi | 41 |
| 4.2.7 | Selektivitas | 39 |
| 4.2.8 | Waktu Pakai | 43 |
| 4.3 | Aplikasi Metode Skanometri Pada Sampel Minuman Kopi dibandingkan Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis | 44 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN..... | | 47 |
| DAFTAR PUSTAKA | | 49 |
| LAMPIRAN..... | | 53 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 2. 1 Kandungan senyawa dalam kopi..... | 8 |
| Tabel 2. 2 Kelarutan kafein pada berbagai pelarut dan suhu | 10 |
| Tabel 2. 3 Nilai Presisi yang Memenuhi Syarat pada Tiap Konsentrasi..... | 17 |
| Tabel 2. 4 Nilai Akurasi yang Diperbolehkan Pada Tiap Konsentrasi | 18 |
| Tabel 4. 1 Hasil optimasi volume lempeng sumuran mikro | 31 |
| Tabel 4. 2 Variasi Konsentrasi Reagen NP, MBTH dan Asam Asetat | 32 |
| Tabel 4. 3 Hasil uji selektivitas | 40 |
| Tabel 4. 4 Hasil uji presisi standar kafein 500 ppm..... | 41 |
| Tabel 4. 5 Hasil uji presisi sampel minuman kopi E | 41 |
| Tabel 4. 6 Hasil akurasi standar kafein 500 ppm | 42 |
| Tabel 4. 7 Hasil akurasi sampel minuman kopi E..... | 42 |
| Tabel 4. 8 Hasil penetapan kadar kafein metode skanometri dan spektrofotometri UV-Vis (n=3, $\alpha=0,05$)..... | 46 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| Gambar 2. 1 Struktur kafein..... | 9 |
| Gambar 2. 2 Struktur kimia natrium periodate | 13 |
| Gambar 2. 3 Struktur kimia senyawa MBTH | 13 |
| Gambar 2. 4 Reaksi kimia pembentukan senyawa bewarna biru (Sumber: Singh dan Sahu, 2006) | 14 |
| Gambar 4. 1 Kurva baku kafein pada suhu 50°C..... | 33 |
| Gambar 4. 2 Kurva baku kafein pada suhu 60°C..... | 33 |
| Gambar 4. 3 Kurva baku kafein pada suhu 70°C..... | 34 |
| Gambar 4. 4 Kurva baku kafein menggunakan warna merah (R)..... | 34 |
| Gambar 4. 5 Kurva baku kafein menggunakan warna hijau (G) | 35 |
| Gambar 4. 6 Kurva baku kafein menggunakan warna biru (B)..... | 35 |
| Gambar 4. 7 Kurva baku kafein menggunakan warna RGB..... | 35 |
| Gambar 4. 8 Kurva waktu respon | 36 |
| Gambar 4. 9 Kurva linearitas standar kafein 50-900 ppm | 37 |
| Gambar 4. 10 Kurva penurunan mean blue suhu ruang..... | 43 |
| Gambar 4. 11 Kurva penurunan mean blue suhu lemari es | 44 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| LAMPIRAN 4.1. Penentuan Intensitas Warna | 53 |
| LAMPIRAN 4.2 Penentuan Suhu Pemanasan | 54 |
| LAMPIRAN 4.3. Waktu Respon | 55 |
| LAMPIRAN 4.4. Linearitas | 56 |
| LAMPIRAN 4.5. Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi (LOD dan LOQ) | 56 |
| LAMPIRAN 4.6. Presisi | 57 |
| LAMPIRAN 4.7. Akurasi | 58 |
| LAMPIRAN 4.8. Interferensi | 60 |
| LAMPIRAN 4.9. Waktu Pakai (Stabilitas)..... | 61 |
| LAMPIRAN 4.10. Aplikasi Pada Sampel..... | 62 |

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah negara kepulauan dengan berbagai macam potensi. Indonesia termasuk negara agraris dan maritim, dimana sektor pertanian, kehutanan dan perikananannya berperan besar dalam perekonomian Indonesia. Kopi merupakan salah satu komoditi yang penting dalam perekonomian Indonesia. Menurut Badan Pusat Statistik (2022), tingkat produksi kopi meningkat 1,31 persen pada tahun 2020 dan 3,12 pada tahun 2021. Meningkatnya produksi kopi juga berpengaruh pada tingkat konsumsi kopi di masyarakat. Menurut *International Coffee Organization* (ICO), tingkat konsumsi kopi di dunia meningkat 3,3% pada tahun 2021 dibandingkan tahun sebelumnya. Di Indonesia, tingkat konsumsi kopi meningkat hingga 98% dalam satu dekade terakhir.

Kopi adalah tanaman yang banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari sebagai bahan makanan, minuman dan obat. Salah satu olahan kopi yang banyak digemari oleh masyarakat dari berbagai usia adalah minuman kopi. Minuman kopi banyak disukai oleh masyarakat karena kopi dapat menstimulasi sistem syaraf pusat untuk menghasilkan kewaspadaan dalam waktu singkat (Camargo dan Camargo, 2019). Efek ini ditimbulkan oleh salah satu senyawa yang terkandung dalam kopi, yaitu kafein.

Kafein merupakan sebuah senyawa alami yang berasal dari kelompok Xanthin dan dapat ditemukan pada biji atau buah pada enam puluh tiga spesies tanaman di dunia (Temple dkk., 2017). Kafein memiliki banyak efek fisiologis yang penting, seperti berperan sebagai stimulan sistem saraf pusat, meningkatkan denyut jantung dan meningkatkan aktivitas otak. Kafein juga berperan sebagai stimulan psikoaktif dan diuretik ringan, serta secara medis dapat mengurangi kelelahan fisik dan mengembalikan kewaspadaan saat mengantuk (Yazid dkk., 2019).

Meskipun kafein merupakan zat psikoaktif yang paling banyak dikonsumsi dan dipelajari dalam sejarah, efeknya pada kesehatan manusia masih kontroversial. Umumnya, konsumsi kafein dalam jumlah sedang jarang dianggap sebagai risiko kesehatan, melainkan meningkatkan kinerja tubuh dengan merangsang otot jantung, sekresi lambung dan ginjal, saraf pusat dan sistem pernapasan (Furtado dkk, 2019). Menurut Food and Drug Assossication (FDA), dosis maksimal untuk kafein adalah 400 miligram dalam satu hari. Konsumsi kafein lebih dari 400 miligram akan menyebabkan terjadinya efek samping berupa kecemasan, kegelisahan, insomnia, kelelahan, jantung berdebar, gangguan gastrointestinal dan peningkatan tekanan darah (Nehlig 1999; Furtado dkk, 2019).

Untuk menghindari hal tersebut, perlu dilakukan pengembangan metode untuk penetapan kadar kafein dalam sampel olahan kopi yang berbeda. Terdapat banyak metode yang telah digunakan untuk mendeteksi kafein seperti: spektrofotometri ultraviolet-tampak (UV-Vis), kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), elektroforesis kapiler (CE), spektrometri FT Raman, spektroskopi inframerah (NIR), dan kromatografi gas (GC). Akan tetapi, semua metode yang telah disebutkan memiliki beberapa kelemahan yaitu memerlukan biaya yang mahal dan sulit untuk dioperasikan. Selain itu, dalam menggunakan metode spektrofotometri, meskipun biaya yang dikeluarkan lebih murah, prosedurnya sederhana, dan memberikan akurasi serta reproduktifitas tinggi hanya dari sampel yang kecil, tidak semua peneliti dapat mengakses instrumen ini. Salah satu metode yang dapat dikembangkan untuk penetapan kadar kafein adalah metode kolorimetri.

Metode kolorimetri adalah sebuah metode pengujian yang memanfaatkan perubahan warna untuk menentukan keberadaan analit secara kualitatif atau semikuantitatif. Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan penetapan kafein menggunakan metode kolorimetri pada sediaan farmasi menggunakan reagen natrium periodat, asam asetat dan 3-metil-2-benzotiazolinon (MBTH) menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Singh dan

Sahu, 2006). Sebelum dianalisis, kafein akan dioksidasi menggunakan reagen natrium periodat dan asam asetat. Kemudian, ditambahkan reagen MBTH untuk memberikan warna biru. Mengingat kelemahan spektrofotometri yang telah dijabarkan sebelumnya, perlu dilakukan pengembangan dalam penetapan kadar kafein. Metode skanometri adalah metode penetapan kadar yang diperkenalkan oleh Abbaspour menggunakan scanner komersial untuk memperoleh gambar yang kemudian dianalisis dan diukur intensitas warna dari larutan. Kelebihan metode ini adalah kemudahan penggunaan, waktu scan singkat, biaya terjangkau, mudah dibawa, immobilisasi reaktan mudah, tidak perlu menentukan panjang gelombang maksimal, bisa digunakan untuk sampel yang tidak transparan (Shokrollahi dkk., 2017).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dibahas pada penelitian ini antara lain:

1. Bagaimana kondisi optimum metode skanometri kafein yang meliputi volume lempeng sumuran mikro, konsentrasi reagen NP, MBTH dan asam asetat, suhu pemanasan, dan kanal intensitas warna?
2. Bagaimana karakteristik analisis metode skanometri kafein terhadap standar kafein yang meliputi waktu respon, linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ), selektivitas, presisi, akurasi dan waktu pakai?
3. Bagaimana aplikasi metode skanometri kafein pada minuman kopi dibandingkan dengan metode spektrofotometri UV-Vis?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini antara lain:

1. Menentukan kondisi optimum metode skanometri kafein yang meliputi volume lempeng sumuran mikro, konsentrasi reagen NP, MBTH dan asam asetat, suhu pemanasan, dan kanal intensitas warna.
2. Menentukan karakteristik analisis metode skanometri kafein terhadap standar kafein yang meliputi waktu respon, linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ), selektivitas, presisi, akurasi dan waktu pakai.
3. Menentukan aplikasi metode skanometri kafein pada minuman kopi dibandingkan dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan atas pelaksanaan penelitian ini antara lain:

1. Pengembangan teknologi penetapan kadar kafein menggunakan metode skanometri pada sampel minuman kopi untuk lembaga atau instansi yang tidak dapat menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis.
2. Memberikan informasi kadar kafein dalam sampel minuman kopi menggunakan metode skanometri menggunakan reagen MBTH dan asam asetat.
3. Mampu mendeteksi kafein dalam sampel minuman kopi dengan cepat, mudah, murah dan akurat.
4. Penelitian ini diharapkan bisa digunakan sebagai dasar penelitian penetapan kadar kafein menggunakan metode skanometri lebih lanjut.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kopi (*Coffea* sp.)

Kopi merupakan salah satu tanaman dari famili Rubiaceae dan genus *Coffea*. Tanaman ini banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari sebagai bahan makanan, minuman dan obat. Kopi tumbuh pada daerah tropis maupun subtropis dengan ketinggian di atas 800 meter. Secara umum, kopi memiliki banyak jenis, akan tetapi yang paling banyak dikonsumsi adalah jenis kopi arabika dan robusta.

2.1.1 Taksonomi Kopi

Menurut *United States Department of Agriculture (USDA)*, taksonomi tanaman kopi adalah sebagai berikut:

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Viridiplantae

Superdivisi: Embryophyta

Divisi: Tracheophyta

Kelas: Magnoliopsida

Subkelas: Asteridae

Ordo: Gentianales

Famili: Rubiaceae

Genus: *Coffea*

Spesies: *Coffea arabica* L., *Coffea benghalensis* Heyne ex Schult, *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, *Coffea congensis* Froehner, *Coffea liberica* W. Bull ex Hiern, *Coffea stenophylla* G. Don (USDA, 2021)

2.1.2 Morfologi Kopi

Kopi tumbuh di daerah tropis dan subtropis, terutama pada daerah equatorial dengan ketinggian antara 200-1.200 meter pada suhu 18–22°C. Sedangkan tanaman kopi liar tumbuh pada daerah dengan ketinggian 1.300-1.600 meter. Pada iklim yang hangat dan lembab, kopi sangat rentan terhadap infeksi jamur (Patay dkk., 2016a).

Kopi merupakan tanaman yang dapat hidup di alam selama 10 hingga 15 tahun. Bentuk pohon kopi bervariasi bergantung pada spesies dan varietasnya. Secara umum, batang kopi terdiri dari tiga bagian, yaitu batang utama yang tegak dengan cabang lateral primer, sekunder, dan tersier. Cabang ini disebut *suckers* pada tahap perkembangan. Daun kopi berbentuk bulat dengan ujung agak runcing, terlihat mengkilap, bergelombang dan berwarna hijau dengan urat daun yang mencolok (Farah dan Dos Santos, 2015). Kopi arabika memiliki daun yang lebih tipis dan kecil dibandingkan dengan kopi robusta. Selain itu, warna dari daun kopi arabika adalah hijau gelap, sedangkan daun kopi robusta berwarna hijau terang.

Menurut Vionita (2021), buah kopi mentah berwarna hijau terang sedangkan untuk buah kopi yang sudah matang berwarna merah atau merah tua. Panjang dari buah kopi arabika adalah 12-18 mm sedangkan buah kopi robusta memiliki panjang 8-16 mm. Biji kopi secara umum memiliki bentuk lonjong atau elips dan memiliki warna kuning.

2.1.3 Jenis kopi

Kopi merupakan tanaman yang umum diketahui dan tersebar di seluruh dunia. Spesies kopi yang terkenal adalah kopi arabika (*Coffea arabica*), kopi robusta (*Coffea canephora*) dan kopi liberika (*Coffea liberica*) (Patay dkk., 2016a).

a. Kopi arabika

Kopi arabika (*Coffea arabica*) berasal dari Ethiopia dan tumbuh pada tanah dengan ketinggian diantara 1300 hingga 2000 meter. Kopi ini mendominasi sekitar 70% pasar kopi global. Dibandingkan dengan kopi robusta, kopi arabika memiliki kualitas dan aroma yang lebih baik. Hal ini dikarenakan kopi arabika memiliki kadar asam klorogenat yang lebih rendah (Chu, 2012).

b. Kopi robusta

Kopi robusta (*Coffea canephora*) banyak tersebar di daerah Afrika tropis dengan ketinggian di bawah 1000 meter. Tanaman kopi robusta memiliki ketahanan yang tinggi terhadap hama dan penyakit serta mudah dirawat. Kopi robusta mengandung antioksidan dan kafein lebih banyak daripada kopi arabika. Selain itu, kopi robusta juga mengandung asam klorogenat lebih tinggi daripada kopi arabika sehingga membuat kopi robusta memiliki ketahanan terhadap mikroorganisme, serangga dan radiasi UV (Chu, 2012).

c. Kopi liberika

Kopi liberika (*Coffea liberica*) adalah jenis kopi yang berasal dari Afrika. Kopi liberika menyediakan sekitar 2% dari total produksi kopi di dunia. Meskipun memiliki tingkat kebutuhan yang rendah, ekstrak volatil dari biji mentahnya memiliki kadar antioksidan yang lebih tinggi daripada kopi arabika dan robusta. Kopi ini jarang dibudidayakan karena memiliki kadar kafein yang rendah dan sensitif terhadap *Fusarium xyloriode* (Patay dkk., 2016b).

2.1.4 Kandungan Senyawa

Tanaman kopi mengandung beberapa senyawa kimia, antara lain: air, karbohidrat dan fiber, protein dan asam amino bebas, lemak, mineral, asam organik, asam klorogenat, trigoneline dan kafein (Chu, 2012).

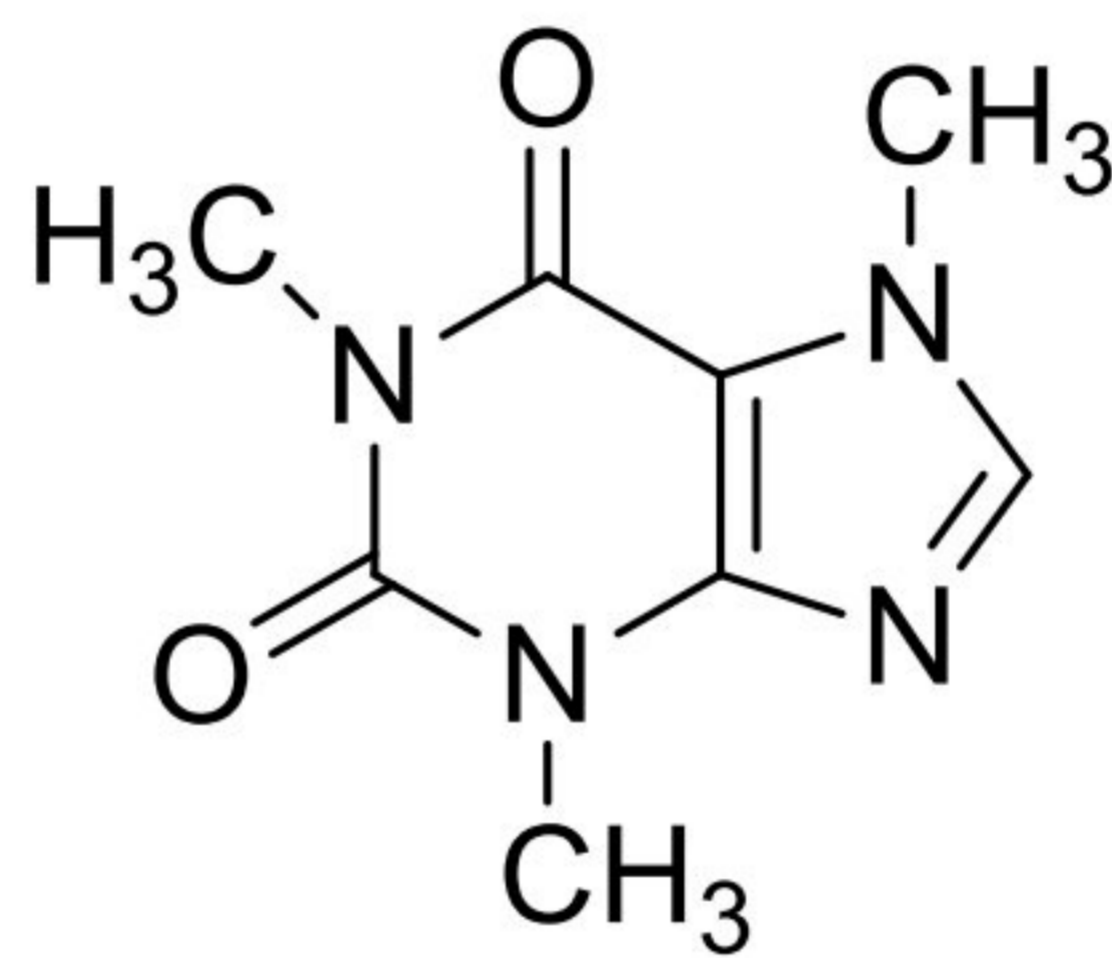
Tabel 2. 1 Kandungan senyawa dalam kopi

| Komponen | Konsentrasi (g/100 g) | |
|--------------------------|-----------------------|--------------|
| | Kopi Arabika | Kopi Robusta |
| Karbohidrat/fiber | | |
| Sukrosa | 6-9 | 0,9-4 |
| Gula Pereduksi | 0,1 | 0,4 |
| Polisakarida | 34-44 | 48-55 |
| Lignin | 3 | 3 |
| Pektin | 2 | 2 |
| Komponen nitrogen | | |
| Protein/peptida | 10-11 | 11-15 |
| Asam amino bebas | 0.5 | 0,8-1 |
| Kafein | 0.9-1,3 | 1,5-2,5 |
| Trigoneline | 0,6-2 | 0,6-0,7 |
| Lemak | | |
| Minyak kopi | 15-17 | 7-10 |
| Diterpena | 0,5-1,2 | 0,2-0,8 |
| Mineral | 3-4,2 | 4,4-4,5 |
| Asam dan ester | | |
| Asam klorogenat | 4,1-7,9 | 6,1-11,3 |
| Asam alifatik | 1 | 1 |
| Asam quinic | 0,4 | 0,4 |

(Sumber: Chu, 2012)

2.2 Kafein

Kafein (1,3,7-trimethylxantine) adalah senyawa alkaloid metilxantin yang ditemukan pada beberapa bagian tanaman seperti kacang, polong, biji dan daun (Zabot, 2019). Kafein umumnya ditemukan pada tanaman *kola nut* (*Cola acuminata*), kakao (*Theobroma cacao*), beri guarana (*Paullinia cupana*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*), kopi (*Coffea* sp) dan daun teh (*Camelia siniensis*) (Richards dan Smith, 2016). Senyawa ini merupakan senyawa yang stabil dalam pemanasan dan konsentrasinya lebih banyak ditemukan pada kopi robusta (Chu, 2012).



Gambar 2. 1 Struktur kafein

Dalam bentuk padatan, kafein tidak memiliki warna dan bau serta memiliki rasa yang sedikit pahit. Kafein tersublimasi pada suhu 180°C dan meleleh pada suhu 136°C di bawah tekanan. Kelarutan kafein bergantung pada tipe pelarut dan suhu. Pada suhu ruang, kafein mudah larut pada pelarut kloroform dibandingkan dengan air. Namun, kafein akan lebih mudah larut pada air mendidih, dimana kelarutannya meningkat hingga 70% w/v (Vuong dan Roach, 2014).

Tabel 2. 2 Kelarutan kafein pada berbagai pelarut dan suhu

| Pelarut | Suhu (°C) | Kelarutan (%w/w) |
|-------------|-----------|------------------|
| Air | 25 | 2,2 |
| Air | 100 | 66,7 |
| Alkohol | 25 | 1,2 |
| Alkohol | 600 | 4,5 |
| Eter | 25 | 0,3 |
| Kloroform | 25 | 2,5 |
| Etil Asetat | 25 | 18 |
| Aseton | 25 | 2 |
| Benzena | 25 | 1 |

Sumber: (Vuong dan Roach, 2014)

Kafein merupakan senyawa yang mudah larut dalam air dan lemak sehingga senyawa ini dapat ditemukan dalam semua cairan tubuh, termasuk saliva dan cairan serebrospinal. Kafein diabsorpsi di usus kecil selama kurang dari satu jam dan terdifusi secara cepat pada jaringan lain. Kafein mencapai puncak plasma 45 menit setelah dikonsumsi dan pada serum setelah dua jam. Kafein memiliki waktu paruh yang lama, sekitar tiga hingga tujuh jam pada orang dewasa. Sedangkan pada bayi, waktu paruhnya sekitar 65 hingga 130 jam karena fungsi ginjal dan hati yang belum sempurna (Barcelos dkk., 2020). Efek samping kafein seperti takikardia, aritmia dan kejang dapat diamati pada dosis 1200 mg (FDA, 2018).

Menurut *FDA (Food Drug Administration)*, batas normal konsumsi kafein adalah 400 mg per hari. Apabila dikonsumsi dalam batas normal, kafein dapat merangsang sistem saraf pusat sebagai antagonis reseptor adenosin. Hal ini disebabkan karena kafein berasal dari kelompok xanthine adalah senyawa yang dapat menstimulasi sistem syaraf pusat untuk membangkitkan kewaspadaan dalam waktu singkat (Camargo dan Camargo, 2019). Kafein juga dapat meningkatkan kewaspadaan, kemampuan belajar, kinerja olahraga, dan mengubah suasana hati. Dalam kehidupan sehari-hari, kafein dapat meningkatkan kinerja dalam menjalankan tugas, menyetir dan dalam pekerjaan industri. Sedangkan dalam bidang kesehatan, kafein dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan sakit kepala dan sudah digunakan sebagai stimulan

pernafasan pada bayi prematur (Holstege dan Holstege, 2014). Dalam dosis tinggi, kafein dapat menimbulkan perasaan gugup, gelisah, tremor, insomnia, hipertensi, mual dan kejang (Maramis dkk., 2013).

Selain dapat menyebabkan efek samping karena konsumsi yang berlebihan, ada beberapa kelompok populasi yang dapat terpengaruh secara negatif terhadap kafein. *European Food Safety Authority* (EFSA) menyatakan bahwa mengonsumsi kafein 5 mg/kg berat badan dapat menyebabkan perubahan perilaku sementara seperti peningkatan gairah, perasaan marah, gugup, atau cemas pada anak-anak. Pada ibu hamil, konsumsi kafein dapat meningkatkan resiko terjadinya keguguran dan berat lahir bayi rendah (LWB). Kafein biasa dikonsumsi untuk mengurangi mual dan rasa tidak nyaman selama kehamilan dengan menurunkan kadar estrogen pada darah. Namun, menurunnya kadar estrogen juga dapat menyebabkan peningkatan resiko keguguran (Jafari dkk., 2022). Selain itu, kafein juga dapat meningkatkan kadar katekolamin yang memiliki efek vasokonstriksi dan dapat menyebabkan hipoksia pada bayi. Kafein juga dapat meningkatkan kadar adenosine monofosfat siklik (cAMP) yang mempengaruhi perkembangan janin dan pertumbuhan sel (Li dkk., 2015). Konsumsi kafein pada masa kehamilan juga dapat meningkatkan resiko terjadinya rendahnya berat lahir bayi (LWB). Hal ini disebabkan karena bayi tidak dapat memproduksi enzim untuk mencerna kafein (Rhee dkk., 2015). Melihat hal ini, beberapa badan pemerintahan membatasi asupan kafein selama kehamilan dari 200-300 mg per hari (Chu, 2012).

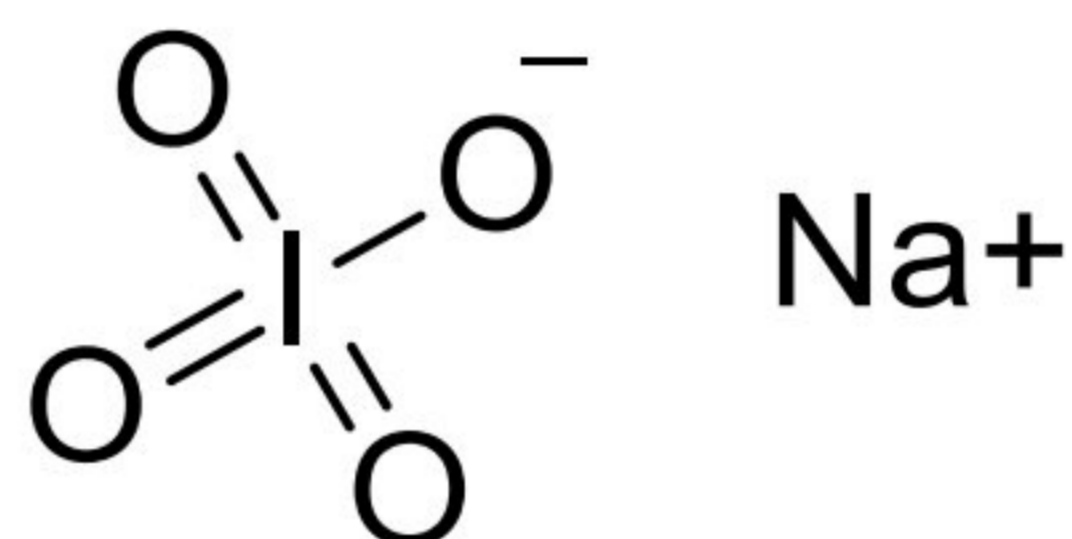
2.3 Metode Skanometri

Metode kolorimetri adalah sebuah metode pengujian yang memanfaatkan perubahan warna untuk menentukan keberadaan analit secara kualitatif atau semikuantitatif. Metode skanometri termasuk dalam subkategori dari metode kolorimetri (Wong dkk., 2014). Metode skanometri diperkenalkan oleh Abbaspour (2011) dengan menggunakan *scanner* komersial untuk memperoleh gambar yang kemudian dianalisis dan diukur intensitas warna dari larutan. Larutan yang sudah discan kemudian dianalisis menggunakan sistem RGB (Red, Green, Blue). Kelebihan metode ini adalah kemudahan penggunaan, waktu scan singkat, biaya terjangkau, mudah dibawa, immobilisasi reaktan mudah, tidak perlu menentukan panjang gelombang maksimal, bisa digunakan untuk sampel yang tidak transparan (Shokrollahi dkk., 2017).

Sistem warna RGB bekerja berdasarkan prinsip bahwa setiap warna terdiri dari komposisi komponen merah (R), hijau (G), dan biru (B). Menurut sistem warna RGB, sebuah warna terbentuk dengan menambahkan cahaya pada warna awal, sehingga system warna RGB juga dikenal dengan sistem warna aditif. Setiap warna dalam spektrum RGB terdiri dari nilai yang berbeda untuk masing-masing komponen merah, hijau, dan biru. Dalam sistem RGB, setiap warna direpresentasikan dalam bentuk (R, G, B), di mana (0, 0, 0) dan (255, 255, 255) masing-masing mengacu pada hitam dan putih. Dalam sistem ini, total 16.777.216 warna dapat dibuat (Shokrollahi dkk., 2017).

2.3.1 Natrium Periodate (NP)

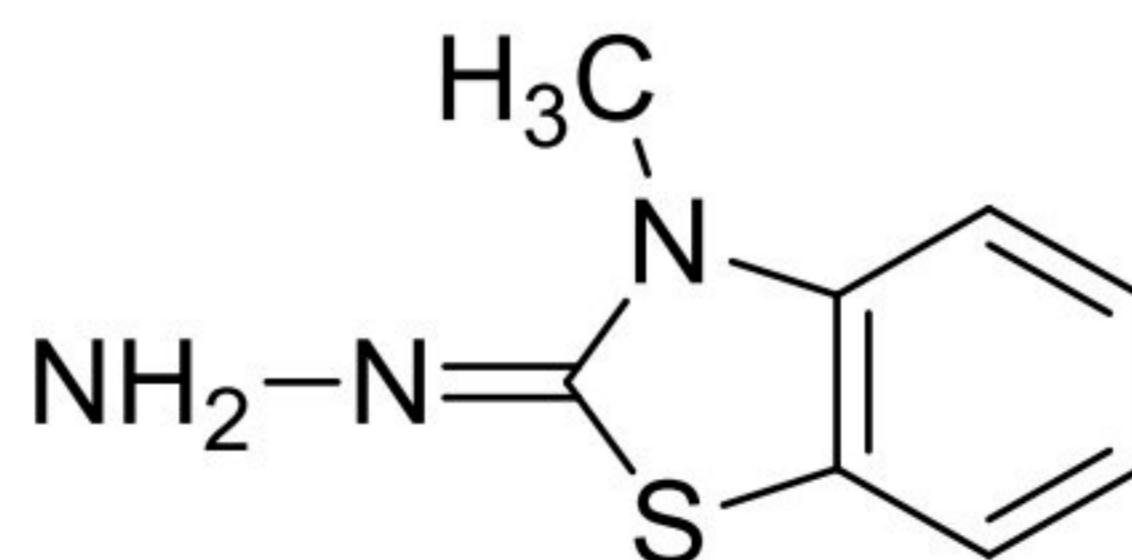
Natrium Periodate (NaIO_4) adalah tetragonal putih, senyawa kristal tidak berwarna dengan berat molekul $213,89 \text{ g mol}^{-1}$, titik leleh 300°C serta berat jenis 3,865. Senyawa ini adalah reagen yang relatif murah dan digunakan secara luas dalam reaksi oksidasi dalam aplikasi sintesis organik. Natrium periodate hanya dapat digunakan dalam air atau pelarut organik berair. Senyawa ini larut dalam air (H_2O), asam sulfat (H_2SO_4), asam nitrat (HNO_3), dan asam asetat (CH_3COOH) tetapi tidak larut dalam pelarut organik yang khas. Natrium periodat reaktif pada pH netral dan dalam kondisi ringan yang kompatibel dengan berbagai fungsi (Sudalai dkk., 2015).



Gambar 2. 2 Struktur kimia natrium periodate

2.3.2 Senyawa kromogenik 3-Metil-2-Benzotiazolinon (MBTH)

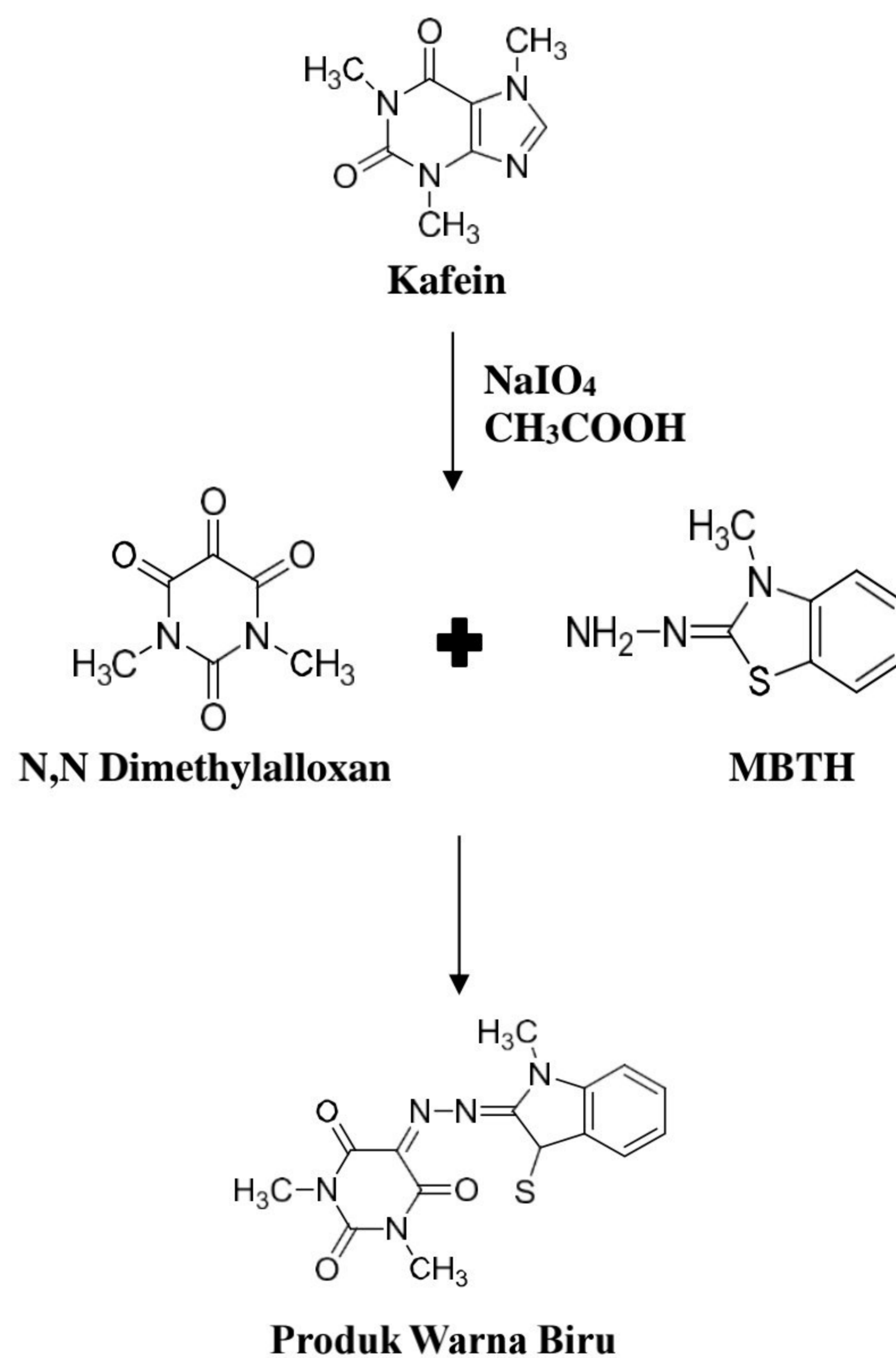
Senyawa 3-metil-2-benzotiazolinon (MBTH) adalah reagen kromogenik yang dipakai dalam metode kolorimetri. MBTH memiliki rumus molekul $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{S}$ dengan berat molekul sebesar $215,7 \text{ g mol}^{-1}$. MBTH memiliki pemerian sebagai kristal atau serbuk kristal atau serbuk berwarna putih atau putih kekuningan dan dapat larut dalam air. Reagen MBTH umumnya digunakan sebagai reagen untuk mendeteksi senyawa fenol, polihidroksi, aldehida, amina aromatik dan senyawa amino hetero aromatik termasuk indoles, karbazol dan fenotiazin.



Gambar 2. 3 Struktur kimia senyawa MBTH

2.3.3 Reaksi Kimia

Pengembangan metode pendeteksian kafein dapat dilakukan dengan mengamati perubahan warna yang terjadi akibat reaksi oksidasi kafein dengan natrium periodate dalam suasana asam. Setelah itu, hasil oksidasi ditambahkan dengan reagen 3-metil 2-benzothiazolinon hydrazone hidroklorida (MBTH). Reaksi ini akan menghasilkan produk berwarna biru yang akan menunjukkan keberadaan kafein dalam sampel (Singh dan Sahu, 2006).



Gambar 2. 4 Reaksi kimia pembentukan senyawa berwarna biru (Sumber: Singh dan Sahu, 2006)

2.4 Karakterisasi Metode Analisis

Sebelum digunakan untuk penetapan kadar, perlu dilakukan validasi metode untuk metode yang sedang dikembangkan. Validasi metode ini dilakukan dengan melihat beberapa karakteristik dari metode analisis.

2.4.1 Linearitas

Linearitas adalah sebuah parameter untuk menilai kemampuan metode analisis dalam mendapatkan hasil uji yang proposional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Menurut *International Council for Harmonisation (ICH)*, linearitas dapat ditentukan menggunakan minimal 5 konsentrasi berbeda, dimana rentang konsentrasi yang digunakan adalah 80-120% konsentrasi uji (Depkes RI, 2020). Parameter untuk menentukan nilai linearitas adalah koefisien korelasi (r) yang diperoleh dari regresi linier $y = bx + a$. Sebuah metode analisis dianggap linier jika nilai r mendekati nilai 1 (Depkes RI, 2020).

2.4.2 Sensitivitas

Sensitivitas adalah kemampuan sebuah metode analisis dalam membedakan konsentrasi analit pada konsentrasi kecil. Nilai sensitivitas dapat ditentukan dengan nilai slope (b) dari persamaan regresi linier $y = bx + a$ (Kuswandi, 2010).

2.4.3 Batas Deteksi dan Batas Kuantitas (LOD dan LOQ)

Batas deteksi (LOD) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi. Batas kuantifikasi (LOQ) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan akurasi dan presisi dalam kondisi percobaan yang sudah ditetapkan (Depkes RI, 2020). Batas deteksi dan batas kuantifikasi dapat dihitung menggunakan metode kurva kalibrasi dengan persamaan:

$$LOD = \frac{3,3 S_a}{b}$$

$$LOQ = \frac{10S_a}{b}$$

Keterangan:

LOD = batas deteksi

LOQ= batas kuantifikasi

Sa = standar deviasi respon

b = kemiringan kurva kalibrasi (Shrivastava dan Gupta, 2011)

2.4.4 Selektivitas

Menurut *International Council for Harmonisation* (ICH), selektivitas adalah kemampuan metode analisis untuk menetapkan keberadaan analit dengan tambahan bahan pengganggu. Selektivitas metode dapat ditunjukkan dengan menambahkan bahan pengganggu seperti cemaran atau eksipien pada senyawa obat dan hasil penetapan kadar tidak dipengaruhi oleh bahan yang ditambahkan (Depkes RI, 2020). Selektivitas dikatakan baik apabila nilai interferensinya sebesar <5% (Ermer dan Nethercote, 2015).

$$\% \text{selektivitas} = \frac{\text{massa kafein analisis} - \text{massa kafein teoritis}}{\text{massa kafein teoritis}} \times 100\%$$

2.4.5 Presisi

Presisi adalah kedekatan respon analit antara hasil uji apabila prosedur digunakan secara berulang terhadap sampling ganda atau sampling homogen. Parameter untuk menentukan nilai presisi adalah nilai standar deviasi relatif (RSD) maupun standar deviasi koefisien variasi (CV). *International Council for Harmonisation* (ICH) merekomendasikan penentuan presisi menggunakan minimal 9 penentuan, termasuk 3 tingkat konsentrasi berbeda yang ditentukan atau minimal 6 penentuan pada konsentrasi uji (Depkes RI, 2020). Presisi dapat dinyatakan sebagai reproduibilitas atau reipitabilitas. Reprodusibilitas adalah

kedekatan respon analit yang diukur dalam waktu yang berbeda namun dengan kondisi yang relatif sama sedangkan riptabilitas adalah kedekatan respon analit yang diukur pada waktu dan kondisi yang sama.

Tabel 2. 3 Nilai Presisi yang Memenuhi Syarat pada Tiap Konsentrasi

| Konsentrasi Analit (%) | Unit | RSD (%) |
|------------------------|---------|---------|
| 100 | 100% | 1,3 |
| ≥100 | 10% | 2,7 |
| ≥1 | 1% | 2,8 |
| ≥0,1 | 0,1% | 3,7 |
| 0,01 | 100 ppm | 5,3 |
| 0,001 | 10 ppm | 7,3 |
| 0,0001 | 1 ppm | 11 |
| 0,00001 | 100 ppb | 15 |
| 0,000001 | 10 ppb | 21 |
| 0,0000001 | 1 ppb | 30 |

Sumber: (Huber, 2007)

2.4.6 Akurasi

Akurasi adalah parameter yang menunjukkan kedekatan hasil analisis analit yang terdeteksi dengan nilai sebenarnya. Untuk mendapatkan nilai akurasi yang tinggi, dapat menggunakan peralatan yang terkalibrasi, reagen dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu baik, serta dilakukan sesuai prosedur. Akurasi dinyatakan sebagai persentase perolehan kembali (%*recovery*) (Harmita, 2004). Dokumen *International Council for Harmonisation* (ICH) merekomendasikan bahwa akurasi ditetapkan dengan menggunakan minimal 9 penetapan meliputi 3 tingkat konsentrasi berbeda yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2020). Persentase perolehan kembali dihitung dengan menggunakan:

$$\%recovery = \frac{\text{konsentrasi hasil percobaan}}{\text{konsentrasi teoritis}} \times 100\%$$

Akurasi dapat ditentukan dengan dua metode, yaitu:

a. Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*)

Penentuan nilai akurasi menggunakan metode simulasi dilakukan dengan cara sejumlah analit ditambahkan ke dalam plasebo (campuran sediaan farmasi) dan dianalisis. Kadar yang telah didapatkan kemudian dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (Harmita, 2004).

b. Metode penambahan standar (*standard addition*)

Penentuan nilai akurasi menggunakan metode penambahan standar dilakukan dengan cara sejumlah analit ditambahkan ke dalam sampel yang telah dianalisis. Setelah dianalisis, selisih antara kedua hasil analisis tersebut kemudian dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (Harmita, 2004). Penentuan akurasi menggunakan metode ini dilakukan apabila tidak dimungkinkan membuat sampel plasebo karena matriks tidak dapat diketahui atau analit berupa senyawa endogen.

Tabel 2. 4 Nilai Akurasi yang Diperbolehkan Pada Tiap Konsentrasi

| Konsentrasi Analit (%) | Unit | <i>Mean Recovery</i> (%) |
|------------------------|---------|--------------------------|
| 100 | 100% | 98-102 |
| ≥100 | 10% | 98-102 |
| ≥1 | 1% | 97-103 |
| ≥0,1 | 0,1% | 95-105 |
| 0,01 | 100 ppm | 90-107 |
| 0,001 | 10 ppm | 80-110 |
| 0,0001 | 1 ppm | 80-110 |
| 0,00001 | 100 ppb | 80-110 |
| 0,000001 | 10 ppb | 60-115 |
| 0,0000001 | 1 ppb | 40-120 |

Sumber: (Huber, 2007)

2.4.7 Waktu Respon

Berdasarkan rekomendasi *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), waktu respon adalah waktu ketika campuran reagen dan analit menghasilkan respon yang stabil (*steady state*).

2.4.8 Waktu Pakai

Waktu pakai adalah waktu yang menunjukkan lama masa pakai sistem. Waktu pakai didefinisikan sebagai waktu dari campuran reagen dan analit memberikan respon yang stabil terhadap analit hingga waktu dimana respon sensor terhadap analit mengalami penurunan lebih dari 15% dari respon awal (Kuswandi, 2010).

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimental laboratorium.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian mulai dilakukan pada bulan September 2022 hingga Mei 2023 di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.3 Rancangan Penelitian

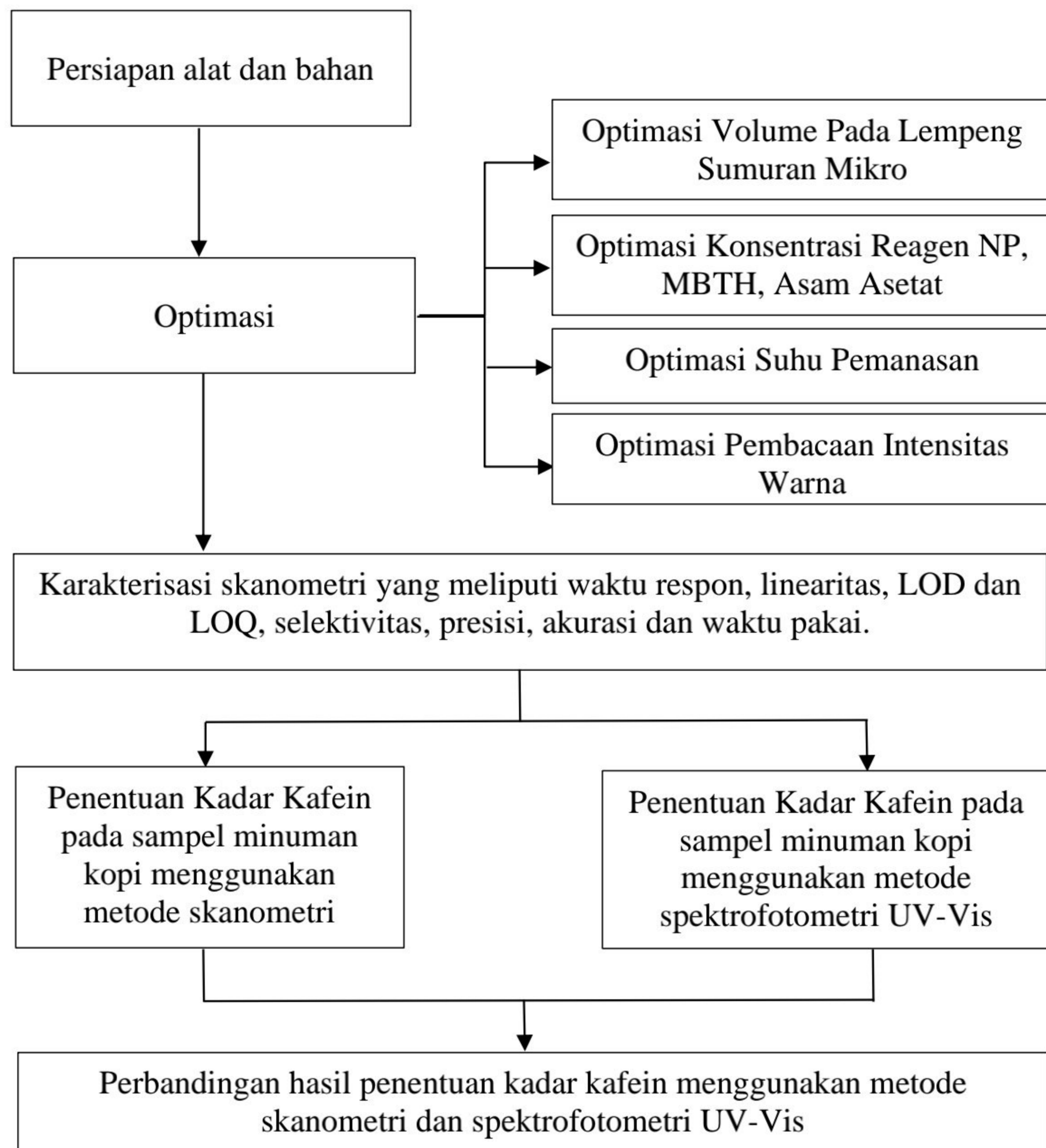
3.3.1 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini terdiri dari:

1. Metode skanometri kafein adalah metode untuk menentukan keberadaan kafein menggunakan *scanner* untuk memperoleh gambar yang kemudian dianalisis intensitas warnanya menggunakan nilai RGB.
2. RGB (*Red, Green, Blue*) adalah analisis warna yang digunakan pada aplikasi *ImageJ* untuk mengetahui perubahan warna yang terjadi setelah penambahan reagen NP), asam asetat dan MBTH.
3. $\Delta mean\ blue$ adalah selisih antara *mean blue* blanko dan *mean blue* standar kafein maupun larutan sampel.
4. Pengambilan gambar untuk mengamati perubahan warna larutan di lempeng sumuran mikro dilakukan dengan menggunakan scanner.
5. Sampel yang digunakan adalah beberapa minuman kopi yang tersedia dipasaran.

3.3.2 Diagram Alur Penelitian

Diagram alur penelitian ini adalah sebagai berikut:



3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan adalah: ball pipet, serangkaian alat gelas, neraca analitik, *ependorf tube*, pipet mikro 10-100 mikroliter, pipet mikro 100-1000 mikroliter, yellow tip, blue tip, well-plate 96, scanner EPSON V800 Pro, oven, botol tetes, spektrofotometri UV-Vis Shimadzu UV-1280.

3.4.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan adalah: serbuk kafein (Sigma-Aldrich), natrium periodate (Sigma-Aldrich), MBTH (Sigma-Aldrich), asam asetat (Smart-Lab), etanol (Smart-Lab), aquadest, diklorometana, sampel bubuk minuman kopi instan.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Larutan Induk Standar Kafein

Larutan induk kafein dibuat 2 konsentrasi, yaitu 2500 ppm dan 3000 ppm. Larutan induk kafein 2500 ppm dibuat dengan menimbang 0,25 gram kafein dan dilarutkan etanol pada labu ukur 100 ml hingga tanda batas. Larutan induk kafein 3000 ppm dibuat dengan menimbang 0,3 gram kafein dan dilarutkan etanol pada labu ukur 100 ml hingga tanda batas.

3.5.2 Preparasi Larutan Standar Kafein

Larutan standar kafein dibuat dengan konsentrasi 50, 300, 500, 750, dan 900 ppm. Larutan standar kafein 50, 500, dan 750 ppm masing-masing dibuat dengan memipet 0,5 ml, 2 ml dan 3 ml larutan induk kafein konsentrasi 2500 ppm dan diencerkan masing-masing pada labu ukur 25 dan 10 ml. Larutan standar kafein 300 dan 900 ppm dibuat dengan memipet masing-masing 1 ml dan 3 ml larutan induk kafein konsentrasi 3000 ppm dan diencerkan masing-masing pada labu ukur 10 ml.

3.5.3 Preparasi Larutan Reagen Natrium Periodate

Reagen natrium periodate dibuat dengan menimbang 0,053 gram natrium periodate kemudian dilarutkan menggunakan aquadest pada labu ukur 25 ml. Konsentrasi natrium periodate yang diperoleh adalah 0,01 M.

3.5.4 Preparasi Larutan Reagen MBTH

Reagen MBTH dibuat dengan menimbang 0,054 gram MBTH kemudian dilarutkan menggunakan aquadest pada labu ukur 25 ml. Konsentrasi MBTH yang diperoleh adalah 0,01 M.

3.5.5 Preparasi Larutan Reagen Asam Asetat

Reagen asam asetat dibuat dengan menimbang larutan asam asetat glasial sebesar 0,5985 gram kemudian dilarutkan menggunakan aquadest pada labu ukur 100 ml. Konsentrasi asam asetat yang diperoleh adalah 0,1 M.

3.6 Optimasi Reagen dan Konsentrasi Reagen dan Kafein

3.6.1. Optimasi Volume Pada Lempeng Sumuran Mikro

Optimasi volume reagen dilakukan dengan memastikan volume maksimal *well* pada *well plate well plate* menggunakan aquadest. Kemudian, aquadest dipipet sejumlah 100 μ l, 200 μ l dan 300 μ l pada *well* dan diamati volume yang dihasilkan memenuhi, melebihi atau kurang memenuhi *well*.

3.6.2. Optimasi Konsentrasi Reagen NP, MBTH dan Asam Asetat

Optimasi konsentrasi reagen dilakukan dengan membandingkan intensitas warna yang dihasilkan pada beberapa konsentrasi yang akan digunakan. Variasi konsentrasi yang akan diuji dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Variasi konsentrasi reagen NP, MBTH dan asam asetat

| Variasi | NP | MBTH | Asam Asetat |
|---------|---------|---------|-------------|
| A | 0,001 M | 0,001 M | 0,01 M |
| B | 0,01 M | 0,01 M | 0,1 M |
| C | 0,1 M | 0,1 M | 1 M |

3.6.3. Optimasi Suhu Pemanasan

Optimasi suhu pemanasan dilakukan dengan cara membandingkan intensitas warna campuran *standar* dan reagen yang telah dipanaskan di oven pada suhu 50, 60 dan 70 derajat celcius.

3.6.4. Optimasi Pembacaan Intensitas Warna

Optimasi pembacaan intensitas warna dilakukan dengan mengukur intensitas warna *Red* (R), *Green* (G), *Blue* (B) dan RGB pada hasil scan lempeng sumuran mikro dan dibandingkan nilai koefisien korelasi (r).

3.7 Pembuatan Kurva Baku Kafein

Kurva baku kafein dibuat dengan memipet larutan standar kafein pada *well* dan ditambahkan reagen dengan volume yang sudah dioptimasi kemudian direplikasi sebanyak tiga kali. Setelah itu, *wellplate* di-*scan* menggunakan *scanner* dan dianalisis menggunakan program *image-J* untuk mendapatkan nilai *mean blue*. Kurva baku dibuat antara *nilai mean blue* dan konsentrasi.

3.8 Penentuan Intensitas Warna

Intensitas warna ditentukan dengan melakukan *scanning wellplate* menggunakan *scanner* dan dianalisis menggunakan program *Image-J*. Hasil analisis *image-J* akan menunjukkan komposisi warna RGB dari campuran standar dan reagen pada lempeng sumuran mikro. Nilai yang akan diukur adalah nilai *mean blue*.

3.9 Karakteristik Sensor Kimia

3.9.1. Waktu Respon

Waktu respon diuji pada larutan standar kafein pada konsentrasi optimum yang direplikasi sebanyak 3 kali. Pengukuran intensitas warna dilakukan setiap 2 menit hingga dicapai kondisi *steady state*. Penentuan waktu respon dilakukan dengan membuat kurva antara waktu dengan intensitas warna (*mean blue*). Waktu respon sensor adalah waktu pertama kali sensor memberikan respon sinyal yang stabil.

3.9.2. Linearitas

Uji linearitas dilakukan dengan menguji campuran standar kafein dengan reagen dan diukur intensitas warna yang dihasilkan (*mean blue*). Parameter linearitas yang digunakan adalah koefisien korelasi (r). Koefisien

korelasi didapatkan dari analisis regresi linier dengan persamaan regresi $y = bx + a$. Sensor dianggap linier jika nilai koefisien korelasinya mendekati nilai 1.

3.9.3. Sensitivitas

Sensitivitas ditentukan dengan melihat nilai *slope* pada persamaan regresi linier pada uji linearitas. Semakin besar nilai *slope*, maka semakin sensitif sensor yang dibuat.

3.9.4. Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi (LOD dan LOQ)

Batas kuantifikasi (LOQ) dan batas deteksi (LOD) ditentukan dengan menguji reagen NP, MBTH dan asam asetat pada larutan standar kafein dan diukur nilai *mean blue* menggunakan program *Image-J*. Batas deteksi dan batas kuantifikasi dihitung menggunakan persamaan:

$$LOD = \frac{3,3 S_a}{b}$$

$$LOQ = \frac{10S_a}{b}$$

Keterangan:

S_a= Standar deviasi respon

b= nilai *slope* atau kemiringan kurva baku (Shrivastava dan Gupta, 2011)

3.9.5. Selektivitas

Selektivitas dilakukan dengan membandingkan nilai intensitas warna larutan kafein yang ditambahkan bahan pengganggu dengan larutan standar kafein tanpa bahan pengganggu. Pengganggu yang digunakan adalah asam klorogenat dan asam tanat. Perbandingan yang digunakan pada asam klorogenat adalah 1:2, 1:4 dan 1:8. Sedangkan perbandingan yang digunakan untuk asam tanat adalah 1:1, 1:2 dan 1:4. Pengukuran intensitas warna dilakukan sebanyak

3 kali replikasi. Nilai %interferensi dihitung menggunakan persamaan:

$$\%interferensi = \frac{\text{massa kafein analisis} - \text{massa kafein teoritis}}{\text{massa kafein teoritis}} \times 100\%$$

3.9.6. Presisi

Presisi ditentukan dengan mengukur standar kafein konsentrasi 500 ppm dengan enam kali pengulangan. Data intensitas warna dimasukkan kedalam kurva baku presisi dan ditentukan massa kafein yang dianalisis. Setelah itu, dihitung kedekatannya dengan nilai standar deviasi relatif (RSD).

3.9.7. Akurasi

Akurasi ditentukan dengan metode adisi. Standar yang ditambahkan sebesar 30%, 45% dan 60% dari kafein konsentrasi 500 ppm dan direplikasi sebanyak 3 kali. Nilai intensitas warna yang didapatkan setelah dianalisis, dimasukkan ke dalam persamaan kurva linearitas kafein sehingga diperoleh massa kafein. Massa kafein kemudian dibandingkan dengan massa kafein teoritis sehingga diperoleh nilai persentase perolehan kembali.

3.9.8. Waktu Pakai

Waktu pakai ditentukan dengan mengukur nilai intensitas warna (*mean blue*) yang didapatkan setelah kafein direaksikan dengan reagen yang digunakan. Waktu pengujian adalah 24 jam dimana campuran reagen dan standar akan disimpan pada suhu kamar ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) ataupun suhu lemari es ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). Sensor dinyatakan sudah tidak layak pakai apabila intensitas warna (*mean blue*) yang dihasilkan mengalami penurunan $\geq 15\%$ dari respon awal.

3.10 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah berbagai minuman kopi yang tersedia dipasaran. Ada lima sampel yang akan digunakan, yaitu sampel A (Robusta), B (Robusta), C (Robusta), D (Robusta), E (Robusta-Arabika *Blend*). Preparasi dilakukan dengan menimbang masing-masing sampel hingga 50 mg dan diberi label. Setelah itu, sampel yang sudah ditimbang diekstraksi menggunakan aquadest sebanyak 25 ml. Larutan kopi kemudian diaduk hingga larut menggunakan *magnetic stirrer* sambil dipanaskan. Setelah larut, kopi disaring menggunakan kertas saring dan ditambahkan diklorometana sebanyak 25 ml. Kafein yang ada dalam larutan kopi kemudian diekstrak dengan bantuan corong pemisah. Ekstraksi dilakukan sebanyak empat kali replikasi (Belay dkk., 2008).

3.11 Aplikasi Metode Penetapan Kadar Kafein

Pada aplikasi metode, dilakukan penetapan kadar kafein pada sampel menggunakan dua metode yang berbeda. Metode yang digunakan adalah metode spektrofotometri UV-Vis dan metode skanometri. Metode skanometri dilakukan dengan memipet 25 μ l larutan standar kafein atau sampel, 50 μ l reagen NP dan 25 μ l larutan asam asetat pada lempeng sumuran mikro dan dipanaskan pada oven suhu 50°C selama 2 menit. Setelah dipanaskan, ditambahkan 100 μ l reagen MBTH dan didiamkan selama 20 menit untuk menunggu waktu respon. Setelah itu, lempeng sumuran mikro discan menggunakan *scanner* EPSON V800 Pro dan diukur nilai *mean blue* menggunakan program *ImageJ*. Konsentrasi kafein ditentukan dengan memasukkan nilai *mean blue* pada kurva baku larutan standar kafein terhadap nilai *mean blue*.

Metode spektrofotometri dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan standar kafein 50-900 ppm dan sampel pada panjang gelombang 630 nm. Kemudian, persamaan regresi kurva baku dibuat menggunakan data

konsentrasi larutan standar kafein dan absorbansi yang diperoleh. Pengukuran kadar kafein menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan memipet 0,5 ml sampel, 1 ml reagen NP dan 0,5 ml larutan asam asetat pada vial. Campuran reagen kemudian dipanaskan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 2 menit. Setelah dipanaskan, campuran reagen ditambahkan 2 ml reagen MBTH dan ditunggu selama 20 menit. Setelah itu, diukur nilai absorbansinya (Singh dan Sahu, 2006). Konsentrasi kafein diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi pada kurva baku persamaan regresi kurva baku standar kafein.

Hasil pengukuran kadar kafein menggunakan metode skanometri dan spektrofotometri UV-Vis kemudian dibandingkan dengan *independent t-test* menggunakan program *microsoft excel* untuk mengetahui nilai rerata yang mengalami perbedaan hasil dari kedua metode dengan melihat nilai signifikannya.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Optimasi Metode Analisis

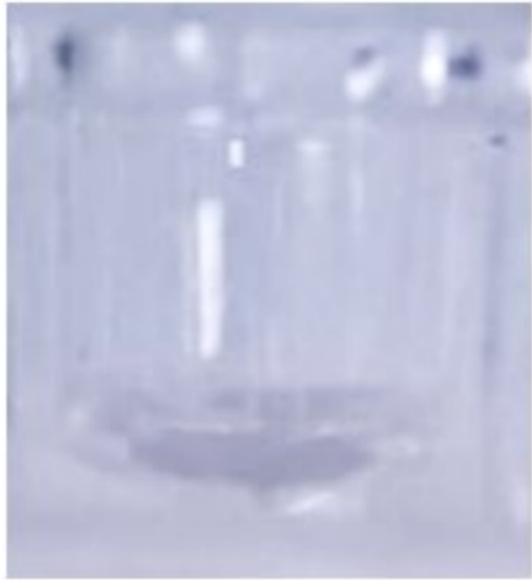
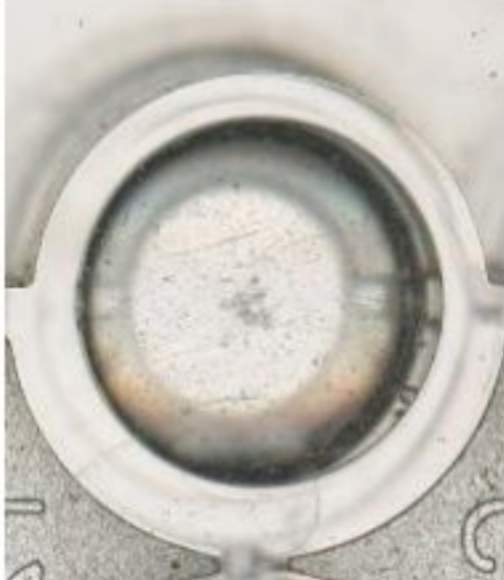

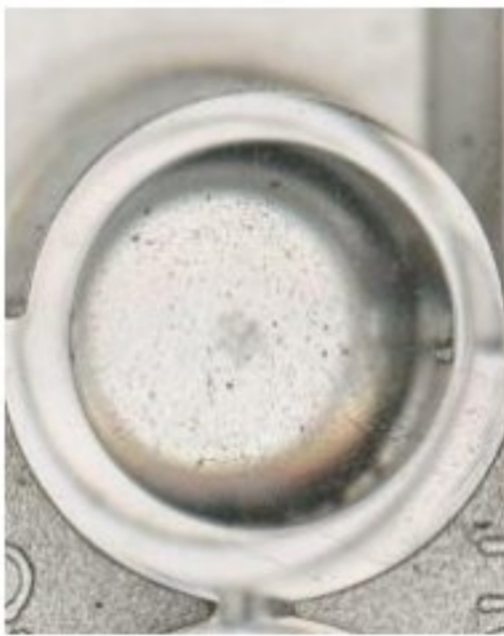


Sebelum melakukan validasi metode analisis, perlu dilakukan optimasi untuk menentukan kondisi optimal dalam validasi metode. Optimasi yang dilakukan adalah optimasi volume pada lempeng sumuran mikro, optimasi konsentrasi reagen natrium periodat (NP), 3-metil-2-benzotiazolinon (MBTH) dan asam asetat, suhu pemanasan dan pembacaan intensitas warna.

4.1.1 Optimasi Volume Pada Lempeng Sumuran Mikro

Optimasi volume pada lempeng sumuran mikro bertujuan untuk mengetahui volume maksimal yang dapat ditampung oleh sumuran. Dengan mengetahui volume maksimal pada sumuran, maka dapat ditentukan total volume yang akan digunakan. Selain itu, kepenuhan sumuran juga akan berpengaruh pada hasil scan. Semakin banyak volume yang terdapat pada sumuran, maka intensitas kecerahan juga akan semakin meningkat sehingga bayangan pada sumuran dapat diminimalisir. Hal ini akan menyebabkan meningkatnya kualitas gambar dan keakuratan dalam perhitungan (Abderrahim, Mohamed, 2016).

Pada penelitian ini, optimasi volume dilakukan dengan memipet akuades sebanyak 100, 200 dan 300 μl ke dalam sumuran. Setelah itu, diamati untuk mengetahui tingkat kepenuhan sumuran dan *discan* untuk melihat bayangan yang terbentuk. Berdasarkan tabel 4.1, diketahui bahwa semakin penuh isi sumuran pada lempeng sumuran mikro maka bayangan yang terbentuk juga semakin berkurang. Dari hasil pengamatan, volume maksimal pada lempeng sumuran mikro adalah 300 μl .

Tabel 4. 1 Hasil optimasi volume lempeng sumuran mikro


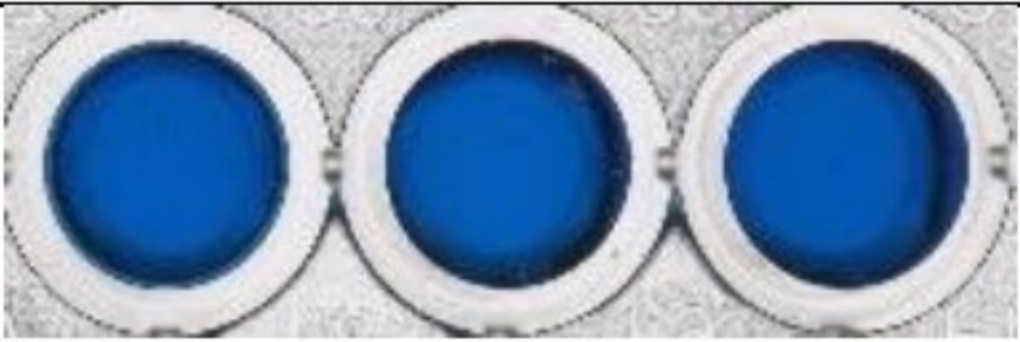

| Volume | Gambar | Hasil Scan |
|-------------|--|---|
| 100 μ l |  |  |
| 200 μ l |  |  |
| 300 μ l |  |  |

4.1.2 Optimasi Konsentrasi Reagen NP, MBTH dan Asam Asetat

Optimasi konsentrasi dilakukan untuk menentukan konsentrasi optimal reagen NP, MBTH dan asam asetat dalam perubahan warna. Perubahan warna terjadi karena adanya hasil oksidasi kafein yang disebabkan oleh penambahan reagen NP dan asam asetat yang dideteksi oleh reagen MBTH, sehingga larutan dapat berubah warna menjadi biru. Pada penelitian sebelumnya, konsentrasi reagen NP, MBTH dan asam asetat, masing-masing 0,01 M; 0,01 M dan 0,1 M dan diukur menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis (Singh dan Sahu, 2006). Karena perbedaan instrumen yang digunakan untuk melakukan pengukuran, maka perlu dilakukan optimasi konsentrasi reagen yang akan digunakan.

Pada variasi konsentrasi A, terjadi perubahan warna menjadi biru pucat. Akan tetapi, warna yang dihasilkan akan berubah menjadi warna bening setelah beberapa menit. Pada variasi konsentrasi B, terjadi perubahan warna menjadi biru. Dibandingkan dengan variasi konsentrasi A, warna biru yang dihasilkan lebih intens dan tidak terjadi perubahan warna kembali setelah beberapa menit. Pada variasi konsentrasi C, terjadi perubahan warna menjadi hitam. Oleh karena itu, dari tiga variasi konsentrasi yang diuji, maka dipilih variasi konsentrasi B yang menghasilkan warna biru untuk digunakan pada uji selanjutnya.

Tabel 4. 2 Variasi Konsentrasi Reagen NP, MBTH dan Asam Asetat

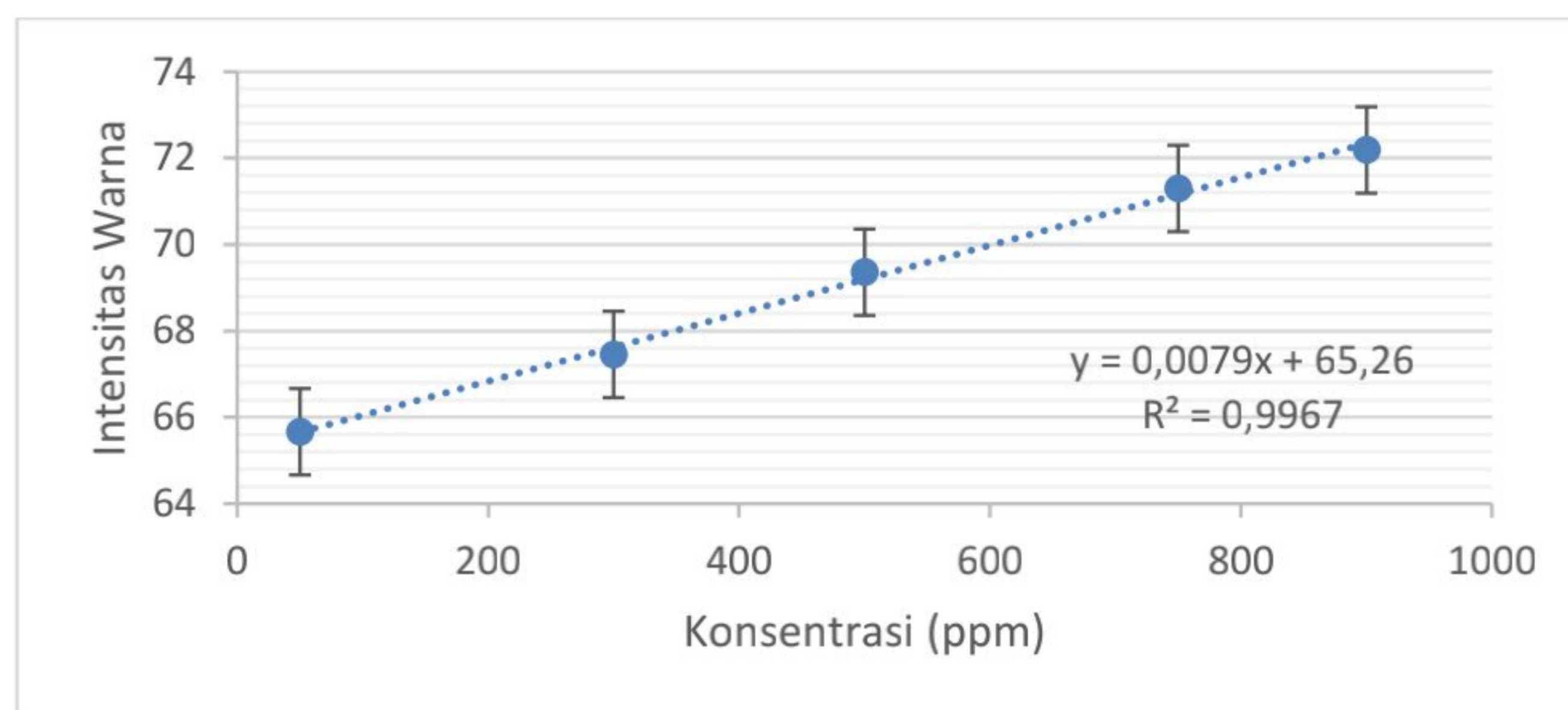
| Variasi | NP | MBTH | Asam Asetat | Gambar |
|---------|---------|---------|-------------|---|
| A | 0,001 M | 0,001 M | 0,01 M |  |
| B | 0,01 M | 0,01 M | 0,1 M |  |
| C | 0,1 M | 0,1 M | 1 M |  |

4.1.3 Optimasi Suhu Pemanasan

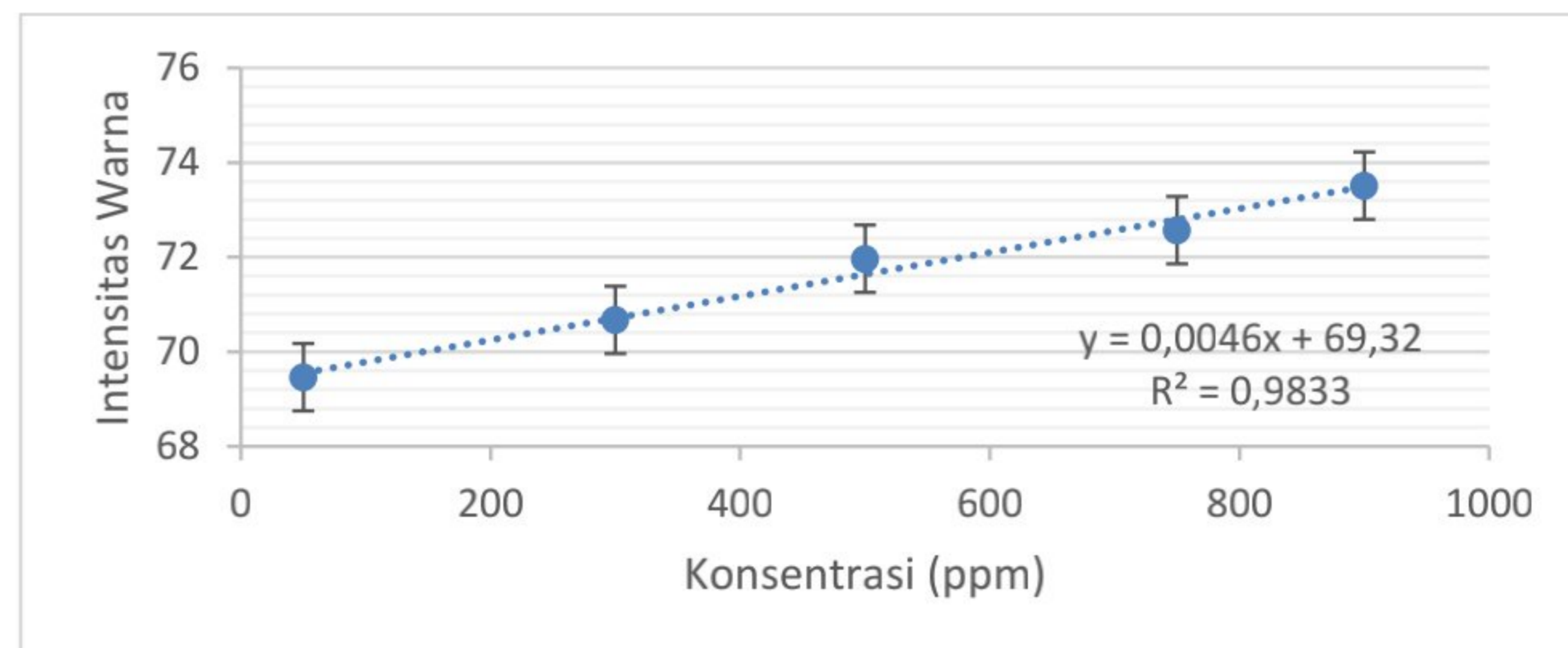
Optimasi suhu pemanasan dilakukan untuk menentukan suhu pemanasan campuran reagen dan standar saat proses oksidasi dan perubahan warna. Pemanasan dibutuhkan untuk mempercepat terjadinya reaksi oksidasi kafein yang disebabkan oleh natrium periodate (NP) dalam suasana asam. Hal ini disebabkan karena suhu yang meningkat akan meningkatkan energi kinetik molekul sehingga reaksi berjalan dengan cepat. Suhu pemanasan yang digunakan adalah 50 °C, 60 °C dan 70°C. Penentuan suhu yang optimal

dilakukan dengan melihat nilai koefisien korelasi (r) pada kurva baku.

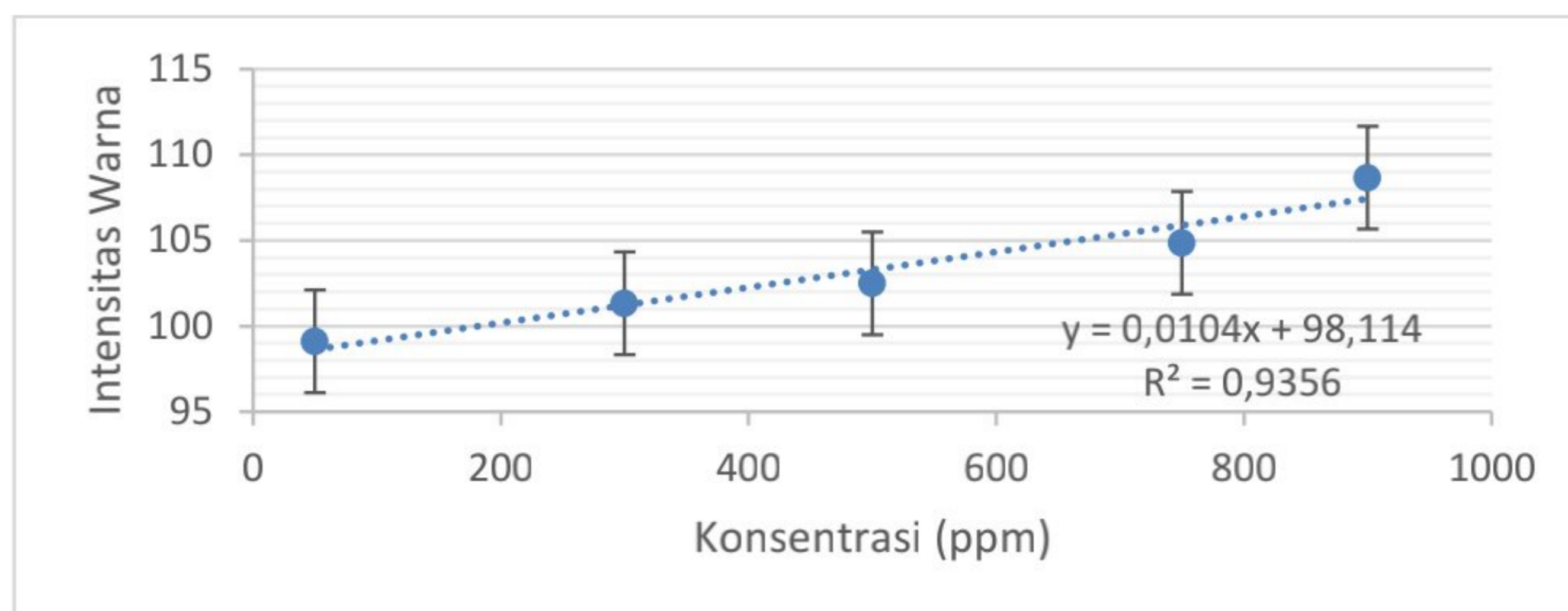
Dari gambar 4.1 hingga 4.3, dapat diketahui nilai koefisien korelasi dari tiap suhu pemanasan. Suhu pemanasan yang digunakan adalah suhu 50°C dengan nilai r sebesar 0,9983 yang merupakan nilai r terbesar dibandingkan dengan nilai r pada suhu pemanasan lainnya.



Gambar 4. 1 Kurva baku kafein pada suhu 50°C



Gambar 4. 2 Kurva baku kafein pada suhu 60°C

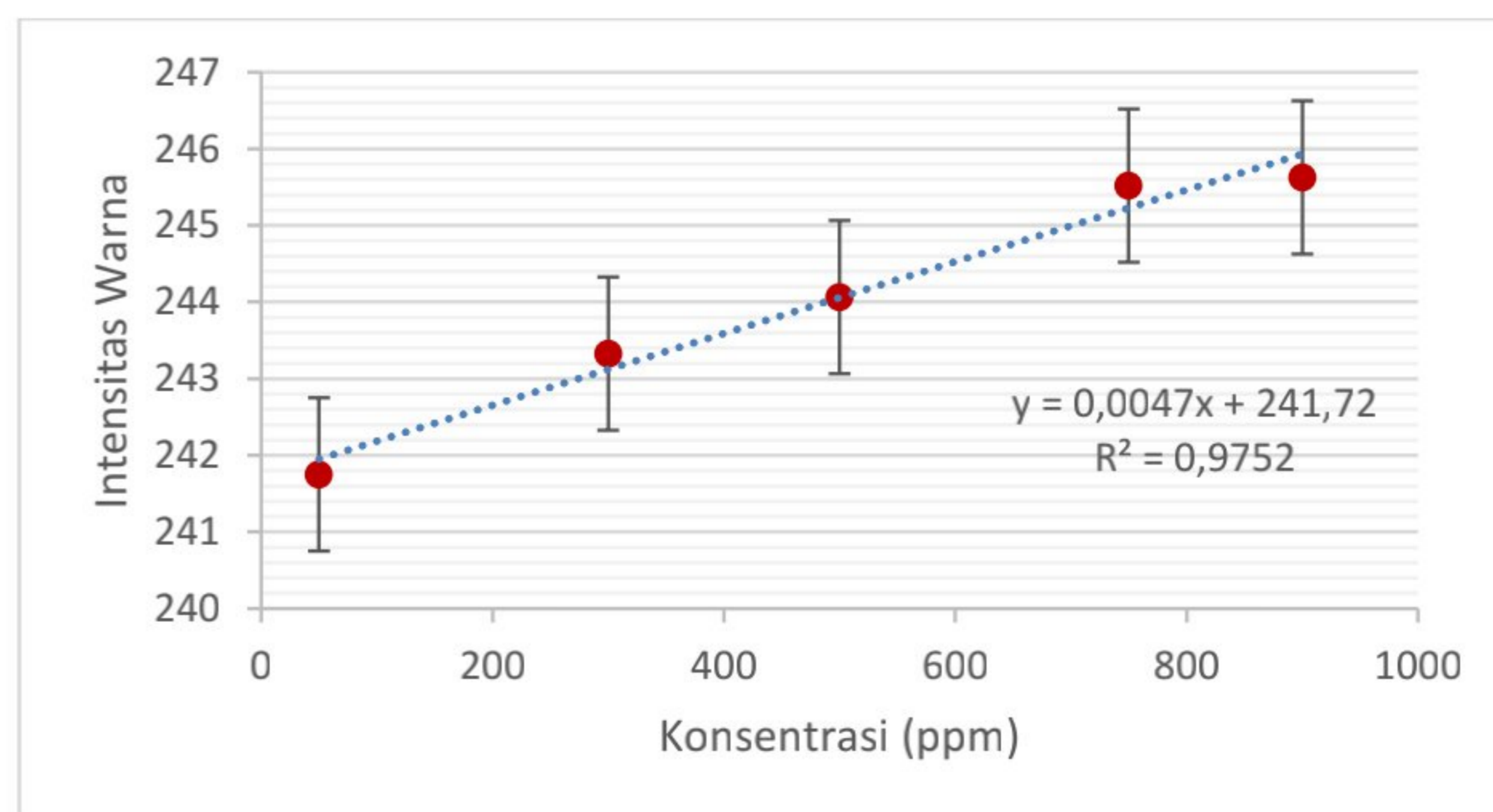


Gambar 4. 3 Kurva baku kafein pada suhu 70°C

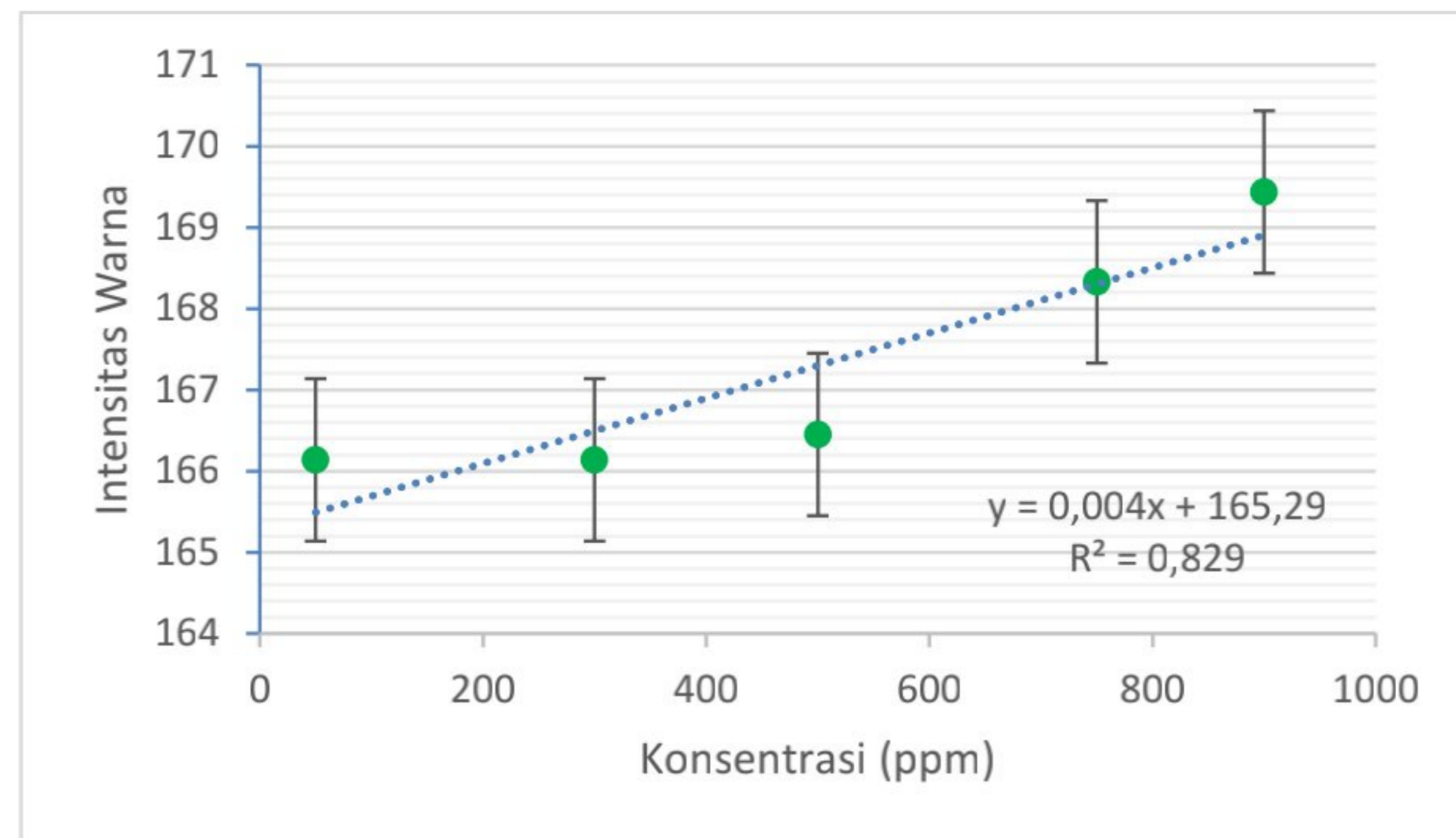
4.1.4 Optimasi Pembacaan Intensitas Warna

Optimasi pembacaan intensitas warna dilakukan untuk menentukan kanal warna yang didapatkan dari analisis hasil scan menggunakan program *ImageJ*. Hasil analisis *ImageJ* akan menghasilkan empat kanal warna, yaitu Red (R), Green (G), Blue (B) dan RGB. Intensitas warna ditentukan menggunakan nilai koefisien korelasi (r) dari tiap kanal warna dan dipilih apabila nilai r mendekati nilai 1.

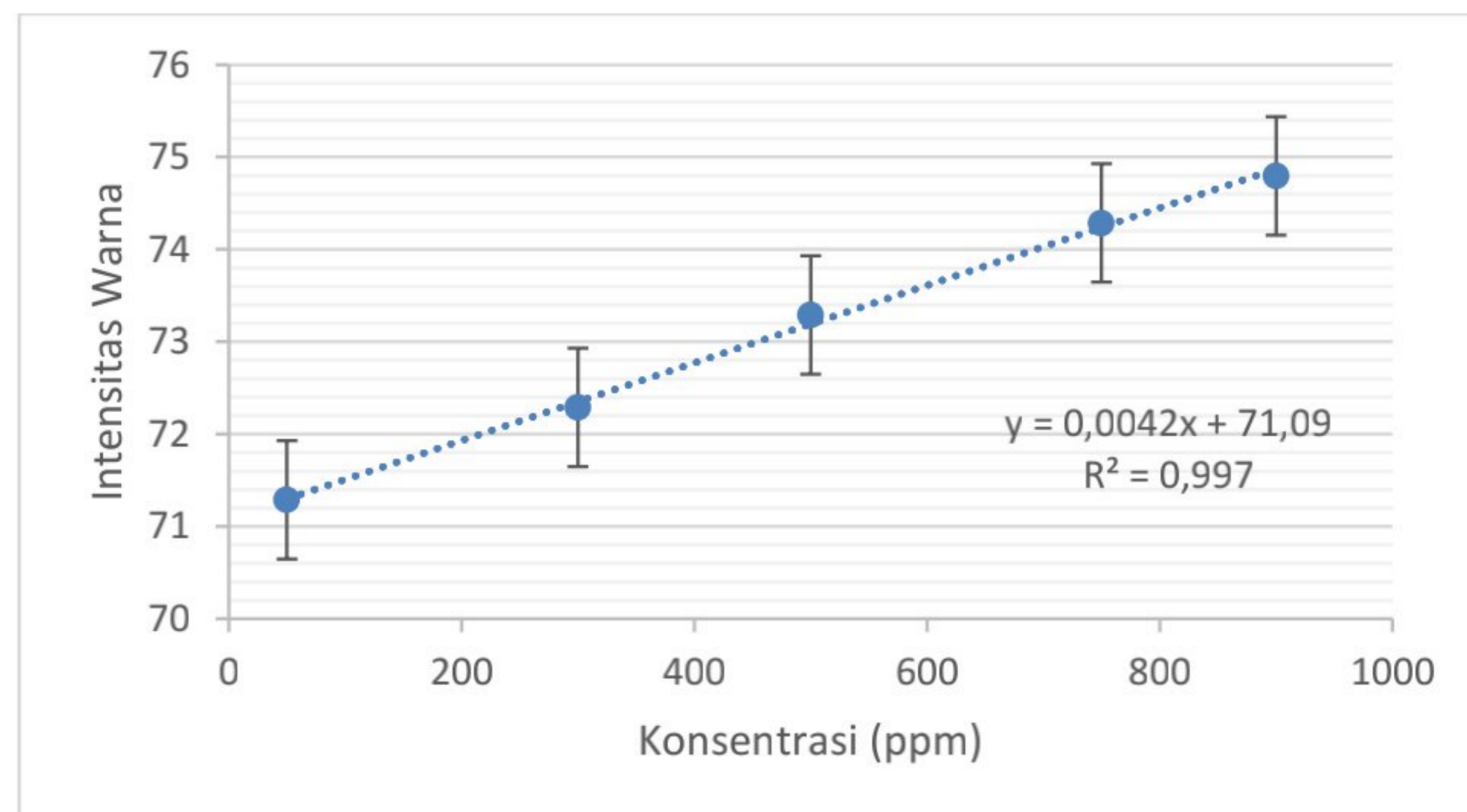
Berdasarkan hasil kurva yang dilihat pada gambar 4.4 hingga 4.7, dipilih kanal warna biru sebagai intensitas warna yang akan diukur dengan nilai r sebesar 0,998 yang merupakan nilai r terbesar dibandingkan dengan nilai r pada kanal warna lainnya.



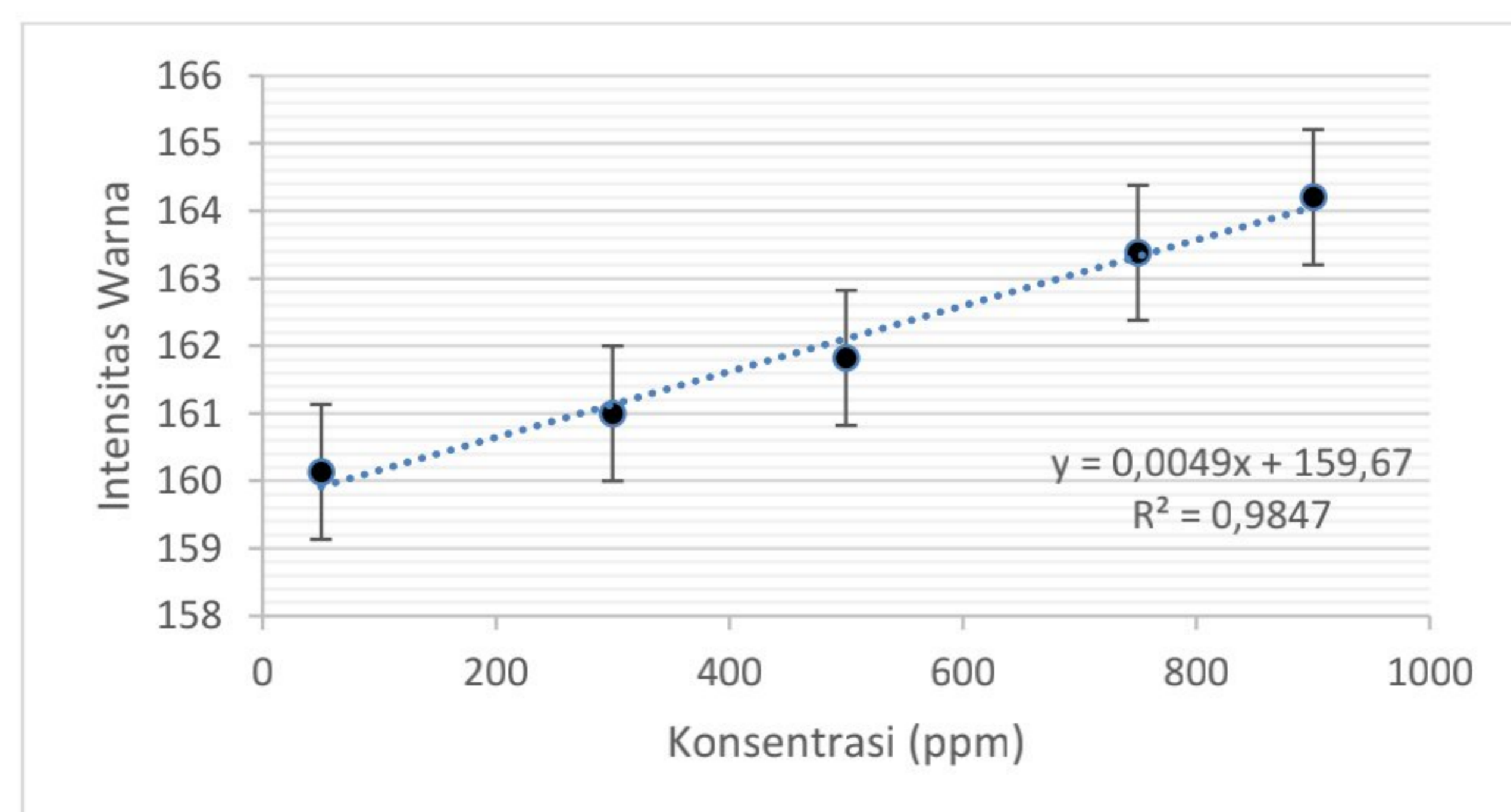
Gambar 4. 4 Kurva baku kafein menggunakan warna merah (R)



Gambar 4. 5 Kurva baku kafein menggunakan warna hijau (G)



Gambar 4. 6 Kurva baku kafein menggunakan warna biru (B)



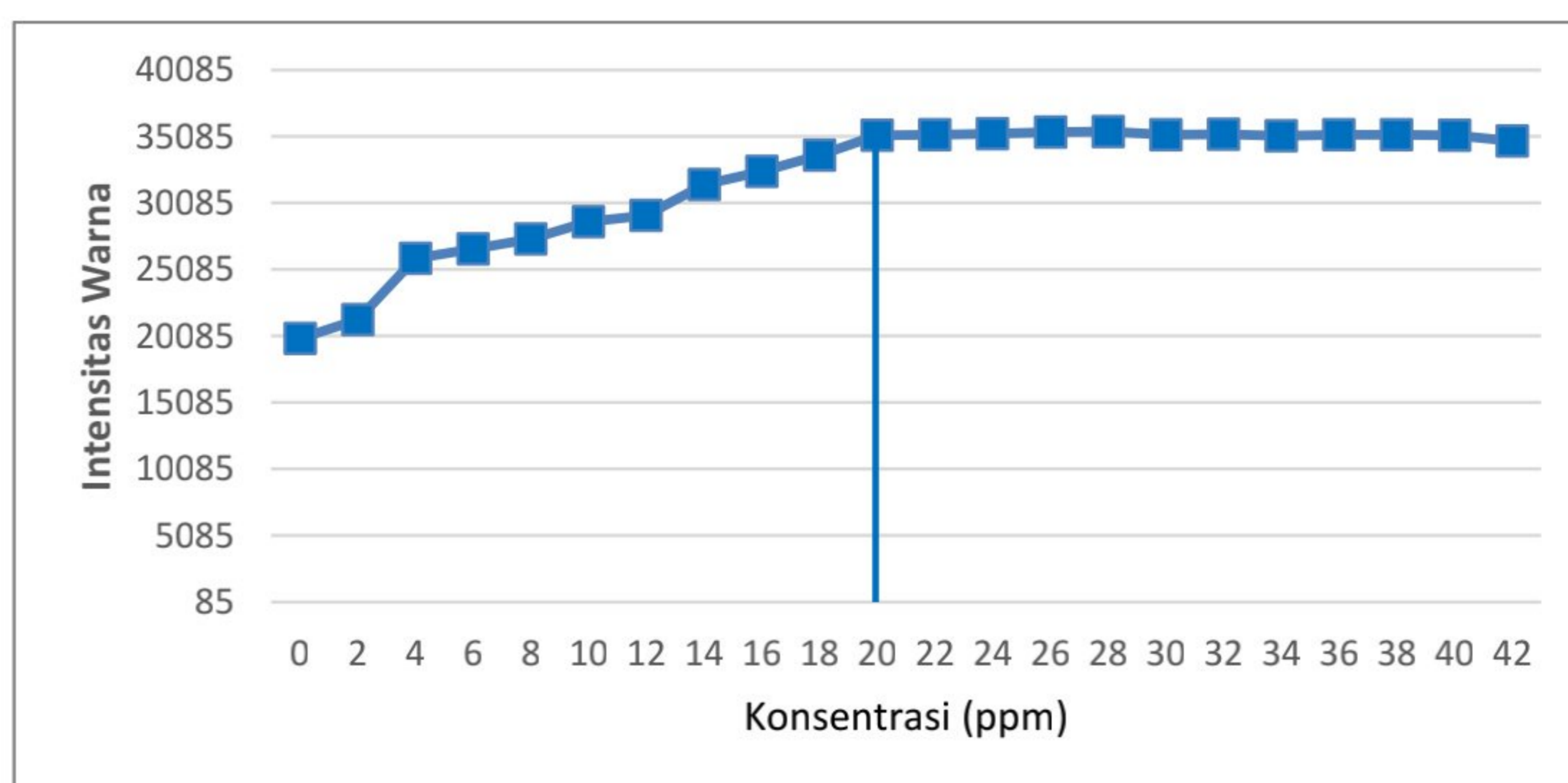
Gambar 4. 7 Kurva baku kafein menggunakan warna RGB

4.2 Karakterisasi Metode Analisis

Setelah dilakukan optimasi, maka dilakukan validasi metode analisis. Validasi adalah proses untuk membuktikan bahwa suatu metode telah memenuhi persyaratan sesuai dengan tujuan penggunaannya (Depkes RI, 2020).

4.2.1 Waktu Respon

Waktu respon adalah waktu yang dibutuhkan campuran reagen dan analit untuk menghasilkan perubahan intensitas warna yang relatif konstan. Waktu respon ditunjukkan dengan nilai perubahan intensitas warna yang *steady state* atau konstan. Waktu respon diukur dengan cara membuat kurva nilai respon *mean blue* terhadap waktu. Pengukuran waktu respon dilakukan setiap dua menit selama satu jam. Berdasarkan kurva waktu respon, diketahui kondisi *steady state* mulai terjadi pada menit ke-20. Oleh karena itu, waktu respon ini akan digunakan untuk pengujian lebih lanjut.

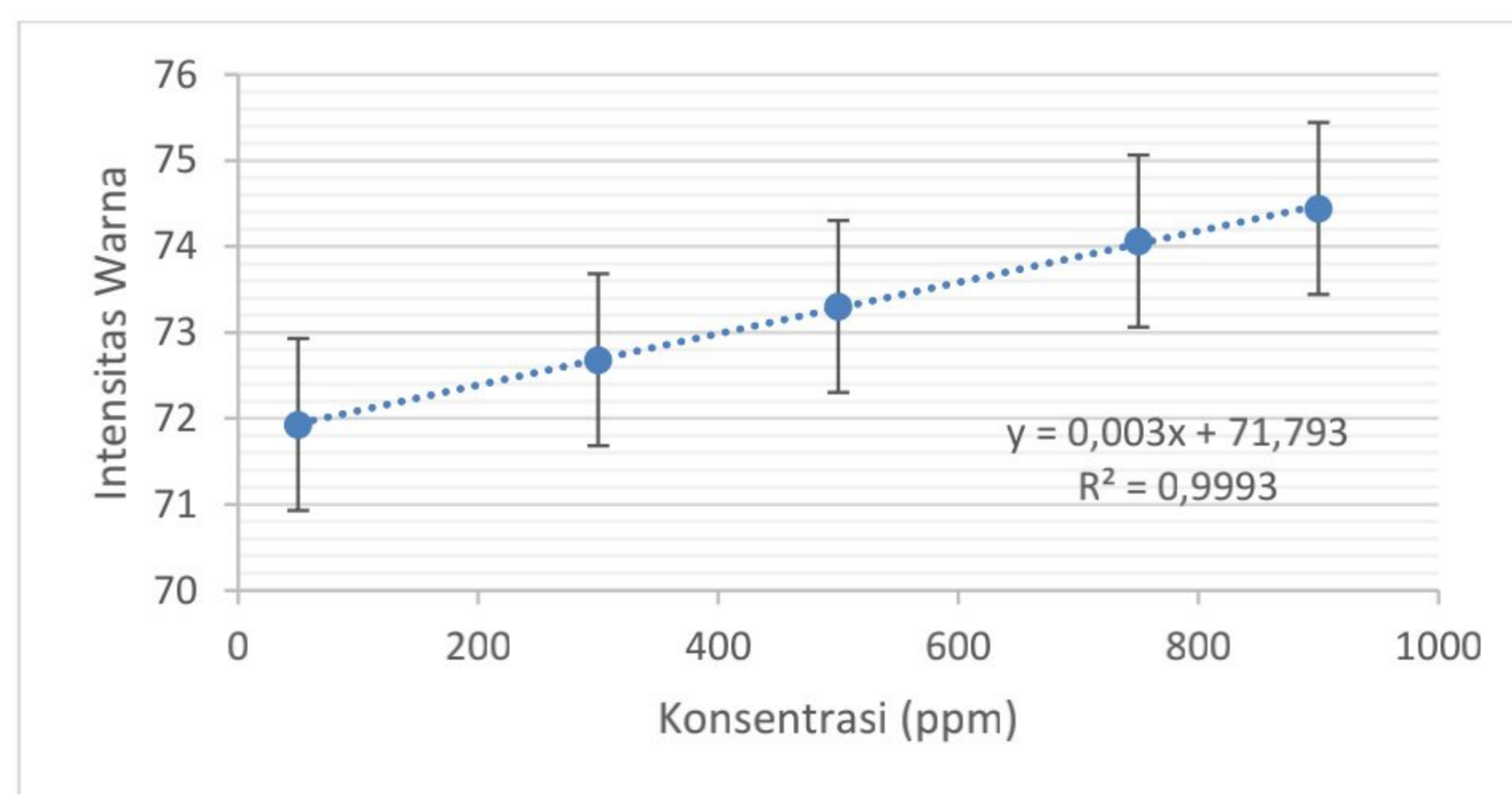


Gambar 4. 8 Kurva waktu respon

4.2.2 Linearitas

Linieritas adalah sebuah parameter untuk menilai kemampuan metode analisis dalam mendapatkan hasil uji yang proposional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Pada penelitian ini, linearitas ditentukan menggunakan larutan standar kafein dengan konsentrasi 50 ppm, 300 ppm, 500 ppm, 750 ppm, dan 900 ppm. Parameter yang digunakan untuk menentukan linearitas metode adalah koefisien korelasi (r) dengan syarat nilai r mendekati nilai 1 (Depkes RI, 2020). Nilai r didapatkan dari kurva baku konsentrasi kafein terhadap intensitas warna ($\Delta mean blue$).

Berdasarkan gambar 4.1, diketahui persamaan regresi adalah $y = 0,003x + 71,793$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9996. Dari hasil linearitas, dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi antara intensitas warna dan konsentrasi standar kafein, dimana warna biru yang dihasilkan akan semakin pekat dengan meningkatnya konsentrasi standar kafein.



Gambar 4. 9 Kurva linearitas standar kafein 50-900 ppm

4.2.3 Sensitivitas

Sensitivitas adalah kemampuan metode untuk membedakan konsentrasi analit dalam konsentrasi kecil. Parameter untuk menentukan nilai sensitivitas adalah nilai *slope* (b) pada persamaan regresi linear. Nilai *slope* (b)

menunjukkan besarnya perubahan nilai intensitas warna apabila nilai konsentrasi yang diukur juga mengalami perubahan. Semakin besar nilai slope, maka semakin besar juga sensitivitasnya (Kuswandi, 2010). Akan tetapi, nilai *slope* yang terlalu besar juga dapat mengganggu hasil pengukuran karena metode akan semakin sensitif terhadap *noise*. Oleh karena itu, nilai *slope* yang diukur untuk parameter sensitivitas merupakan nilai *slope* yang didapatkan dari persamaan kurva regresi linear yang telah memenuhi syarat linearitas dan memiliki nilai *slope error* yang kecil. *Slope error* adalah nilai yang menunjukkan perbedaan nilai *slope* yang diinginkan dengan nilai *slope* kurva linearitas. Semakin kecil nilai *slope error* maka semakin baik linearitas dan sensitivitasnya (Daul dkk., 2021).

Pada gambar 4.9, didapatkan persamaan regresi linear $y=0,003x+71,793$. Dari persamaan regresi tersebut didapatkan nilai *slope* (b) sebesar 0,003. Gambar 4.9 juga menunjukkan garis kurva regresi linear tidak berbeda signifikan dengan garis linearitas yang diharapkan sehingga kurva regresi linear memiliki nilai *slope error* yang kecil. Nilai *slope error* yang kecil menunjukkan nilai sensitivitas yang besar (Daul dkk., 2021). Sehingga dapat disimpulkan bahwa nilai ini menandakan sensitivitas metode skanometri sudah cukup baik untuk dapat mendeteksi perubahan kecil maupun besar dari konsentrasi analit

4.2.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi (*LOD* dan *LOQ*)

Batas deteksi (*LOD*) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi. Sedangkan batas kuantifikasi (*LOQ*) adalah konsentrasi analit terendah yang dapat dideteksi dan ditentukan dengan akurasi dan presisi dalam kondisi percobaan yang sudah ditetapkan (Depkes RI, 2020). Penentuan *LOD* dan *LOQ* dilakukan dengan menghitung nilai standar deviasi dari intensitas warna larutan standar kafein yang digunakan pada uji linearitas. Kemudian, nilai standar deviasi respon yang didapatkan dimasukkan ke dalam

rumus LOD dan LOQ. Nilai LOD yang didapatkan adalah 36,477 ppm dan nilai LOQ yang didapatkan adalah 110,537 ppm. Perhitungan LOD dan LOQ dapat dilihat pada lampiran 4.

4.2.5 Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan metode analisis untuk menetapkan keberadaan analit dengan tambahan bahan pengganggu. Parameter untuk menilai selektivitas adalah persentase selektivitas. Menurut Ermer dan Nethercote (2015), syarat nilai selektivitas adalah kurang dari lima persen. Uji selektivitas dilakukan dengan mencampurkan senyawa pengganggu sejumlah tertentu dalam larutan standar kafein 500 ppm. Pemilihan konsentrasi standar kafein yang digunakan didasarkan pada adanya kemungkinan hasil pengukuran lebih tinggi atau lebih rendah dari nilai intensitas warna konsentrasi 500 ppm, hasil pengukuran masih masuk ke dalam rentang konsentrasi.

Senyawa pengganggu adalah senyawa yang dapat mempengaruhi hasil pengukuran. Pada penelitian ini, senyawa pengganggu yang digunakan adalah asam klorogenat dan asam tanat. Asam klorogenat adalah salah satu senyawa polifenol yang terkandung dalam jumlah besar pada tanaman kopi. Senyawa ini memberikan rasa pahit dan asam pada kopi. Total kandungan asam klorogenat pada kopi robusta 1,5 lebih banyak daripada kopi arabika (Chu, 2012). Asam tanat juga salah satu senyawa polifenol yang terkandung pada kopi sebanyak 3-5% (Sharma, 2020). Kedua senyawa ini dipilih karena merupakan senyawa yang banyak terkandung dalam kopi.

Dari tabel 4.3, diketahui bahwa asam tanat memberikan gangguan pengukuran pada perbandingan 1:4 dan asam klorogenat memberikan gangguan pengukuran pada semua perbandingan. Asam klorogenat memberikan gangguan pengukuran karena adanya senyawa *chlorogenic acid quinone* (CGA-q) hasil oksidasi asam klorogenat dengan natrium periodat.

Senyawa ini kemudian akan berikatan dengan MBTH dan menghasilkan warna merah muda (Hidayat dkk., 2017). Sedangkan asam tanat memberikan gangguan pengukuran karena hasil oksidasinya dapat berikatan dengan MBTH dan menghasilkan warna merah (Hidayat dkk., 2016). Oleh karena itu, perlu dilakukan isolasi kafein dari sampel untuk melakukan penetapan kadar kafein menggunakan metode ini.

Tabel 4. 3 Hasil uji selektivitas

| Interferen | Perbandingan Bobot | %selektivitas |
|--------------------------|--------------------|---------------|
| Kafein : Asam tanat | 1:4 | 5,371 |
| | 1:2 | 4,250 |
| | 1:1 | 2,511 |
| | 1:8 | 22,300 |
| Kafein : Asam klorogenat | 1:4 | 18,161 |
| | 1:2 | 14,838 |

4.2.6 Presisi

Presisi adalah kedekatan respon analit antara hasil uji apabila prosedur digunakan secara berulang terhadap *sampling* ganda atau *sampling* homogen dan dinyatakan dalam nilai standar deviasi relatif (*RSD*) atau nilai koefisien variasi (*CV*). Uji presisi dilakukan dengan standar kafein 500 ppm dan sampel minuman kopi E. Sampel kopi E dipilih karena termasuk dalam kategori *ground coffee* yang memiliki lebih banyak kafein dibandingkan dengan kopi instan. Hal ini disebabkan karena kopi instan terbuat dari ekstrak kopi yang telah didehidrasi sehingga banyak kafein yang terbuang dalam proses pembuatan kopi instan (Chu, 2012). Tujuan dilakukannya uji presisi pada standar dan sampel adalah untuk memastikan bahwa metode yang diuji dapat menghasilkan pengukuran yang memenuhi persyaratan presisi. Presisi dilakukan dengan melakukan replikasi pada standar dan sampel sebanyak enam kali (Depkes RI, 2020).

Berdasarkan tabel 4.4 dan 4.5, didapatkan nilai presisi standar kafein 500 ppm adalah 1,157% dan sampel minuman kopi E sebesar 1,971% dimana nilai ini memenuhi persyaratan nilai presisi yang tertera pada tabel 2.3 halaman 16.

Tabel 4. 4 Hasil uji presisi standar kafein 500 ppm

| Keterangan | <i>Mean blue</i> | Δ <i>mean blue</i> | Konsentrasi (ppm) |
|-------------|------------------|---------------------------|-------------------|
| Blanko | 254,458 | - | - |
| Replikasi 1 | 175,621 | 78,837 | 522,863 |
| Replikasi 2 | 175,690 | 78,768 | 514,745 |
| Replikasi 3 | 175,655 | 78,803 | 518,863 |
| Replikasi 4 | 175,609 | 78,849 | 524,275 |
| Replikasi 5 | 175,663 | 78,795 | 517,922 |
| Replikasi 6 | 175,530 | 78,928 | 533,569 |
| | | Rata-rata | 522,039 |
| | | SD | 6,039 |
| | | <i>RSD (%)</i> | 1,157 |

Tabel 4. 5 Hasil uji presisi sampel minuman kopi E

| Keterangan | <i>Mean blue</i> | Koreksi | Konsentrasi (ppm) |
|-------------|------------------|----------------|-------------------|
| Blanko | 254,458 | - | - |
| Replikasi 1 | 178,275 | 76,183 | 225,333 |
| Replikasi 2 | 178,250 | 76,208 | 215,922 |
| Replikasi 3 | 178,233 | 76,225 | 221,922 |
| Replikasi 4 | 178,275 | 76,183 | 216,392 |
| Replikasi 5 | 178,223 | 76,235 | 219,804 |
| Replikasi 6 | 178,183 | 76,275 | 212,157 |
| | | Rata-rata | 218,588 |
| | | SD | 4,309 |
| | | <i>RSD (%)</i> | 1,971 |

4.2.7 Akurasi

Akurasi adalah salah satu parameter validasi metode yang bertujuan untuk menunjukkan kedekatan hasil analisis analit yang terdeteksi dengan nilai sebenarnya. Nilai akurasi dilihat dari nilai persentase perolehan kembali atau persentase *recovery*. Pengukuran akurasi kafein dilakukan dengan

menggunakan metode standar adisi menggunakan larutan standar kafein 500 ppm dan larutan sampel E. Sampel kopi E dipilih karena termasuk dalam kategori *ground coffee* yang memiliki lebih banyak kafein dibandingkan dengan kopi instan. Hal ini disebabkan karena kopi instan terbuat dari ekstrak kopi yang telah didehidrasi sehingga banyak kafein yang terbang dalam proses pembuatan kopi instan (Chu, 2012). Metode standar adisi dipilih karena dapat memperkecil kesalahan yang disebabkan oleh matriks. Pengukuran akurasi dilakukan dengan menambahkan analit sebanyak 30%, 45% dan 60% dari standar kafein 500 ppm maupun larutan sampel minuman kopi E Setelah itu dilakukan pengukuran akurasi dengan tiga kali replikasi.

Berdasarkan tabel 4.6 dan 4.7, diketahui nilai persentase perolehan kembali standar kafein 500 ppm sebesar 99,914% sedangkan pada sampel minuman kopi E diperoleh persentase perolehan kembali sebesar 98,470%. Merujuk pada tabel 2.4 pada halaman 17, maka dapat disimpulkan bahwa metode skanometri memiliki tingkat akurasi yang baik.

Tabel 4. 6 Hasil akurasi standar kafein 500 ppm

| Adisi (%) | %perolehan kembali |
|------------------|---------------------------|
| 30 | 100,897 |
| 45 | 98,293 |
| 60 | 100,547 |
| Rata-rata | 99,914 |

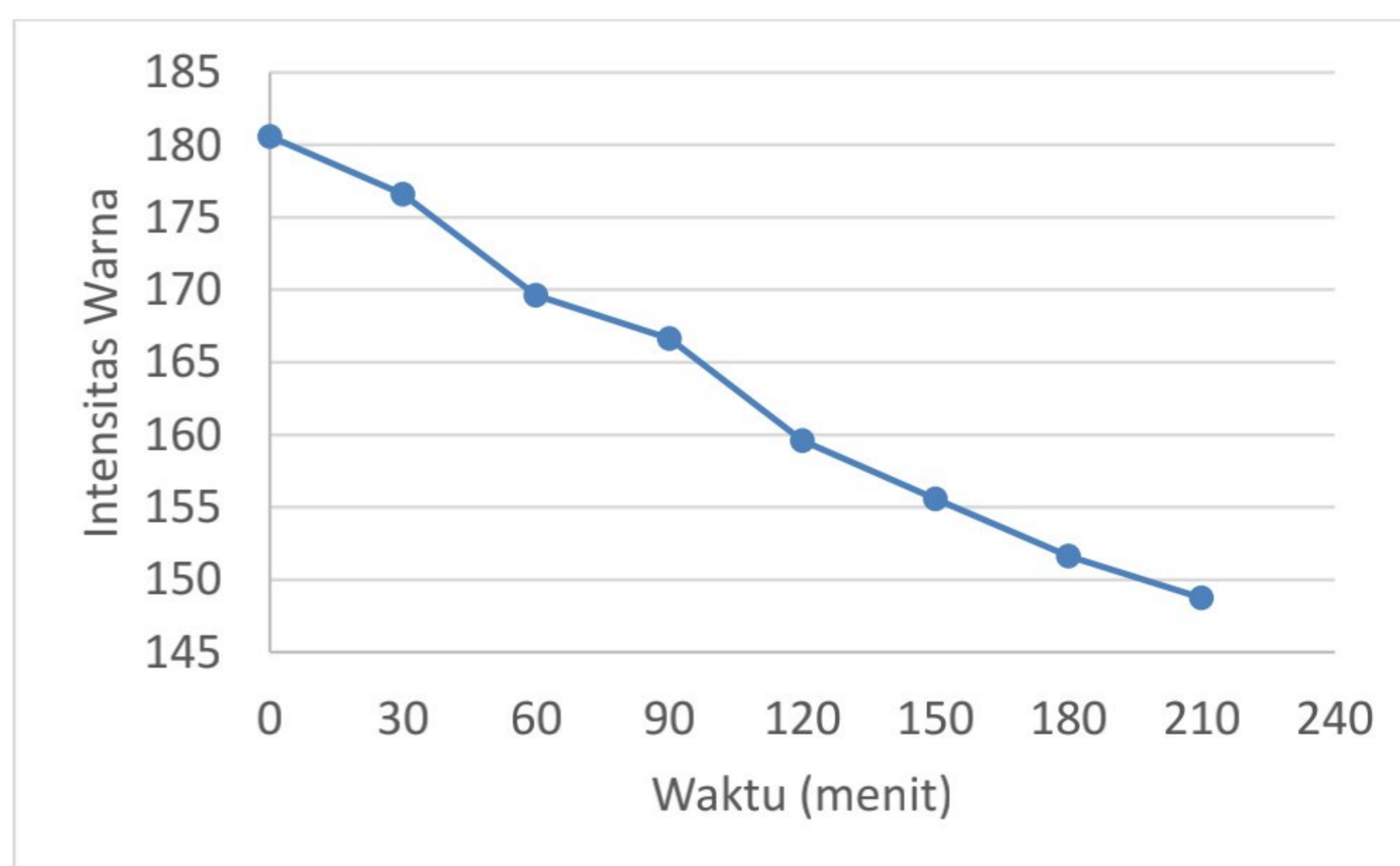
Tabel 4. 4 Hasil akurasi sampel minuman kopi E

| Adisi (%) | %perolehan kembali |
|------------------|---------------------------|
| 30 | 97,542 |
| 45 | 98,946 |
| 60 | 98,915 |
| Rata-rata | 98,470 |

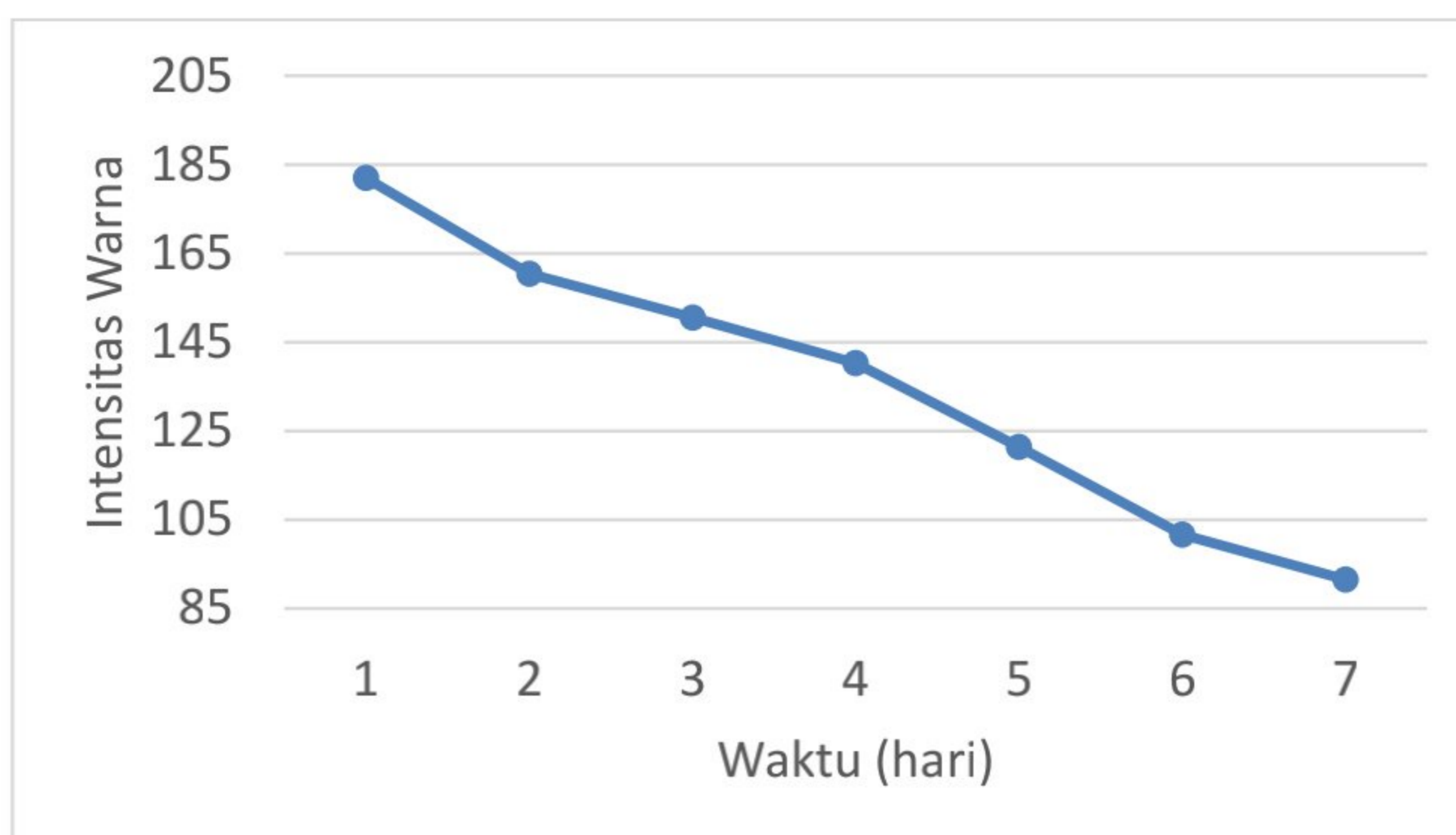
4.2.8 Waktu Pakai

Waktu pakai adalah parameter yang dapat menunjukkan stabilitas dari reagen yang digunakan pada metode yang sedang divalidasi. Pada penerapannya, waktu pakai dilakukan dengan mengukur nilai intensitas warna pada suhu ruang (25°C) dan suhu lemari es (4°C). Apabila nilai intensitas warna mengalami penurunan lebih dari 15% dari nilai intensitas warna awal, maka reagen tidak dapat digunakan kembali. Uji waktu pakai dilakukan dengan mengukur intensitas warna setiap 30 menit pada suhu ruang (25°C) dan setiap 24 jam pada suhu lemari es (4°C).

Pada gambar 4.10 dan 4.11 diketahui bahwa penurunan intensitas warna biru lebih dari 15% ditunjukkan pada menit ke-180 pada suhu 25°C . Sedangkan pada suhu lemari es, penurunan intensitas warna biru lebih dari 15% terjadi pada hari ke-3. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa reagen tidak dapat digunakan kembali setelah disimpan pada suhu ruang selama 180 menit dan setelah disimpan pada suhu lemari es selama 3 hari.



Gambar 4. 10 Kurva penurunan mean blue suhu ruang



Gambar 4. 11 Kurva penurunan mean blue suhu lemari es

4.3 Aplikasi Metode Skanometri Pada Sampel Minuman Kopi dibandingkan Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis

Setelah dilakukan validasi metode, dilakukan aplikasi metode pada sampel. Aplikasi sampel minuman kopi pada metode skanometri dilakukan dengan memipet 25 μ l sampel dan ditambahkan 50 μ l reagen NP dan 25 μ l larutan asam asetat. Campuran reagen dan sampel kemudian dipanaskan pada oven dengan suhu 50°C selama 2 menit. Setelah itu, ditambahkan 100 μ l reagen MBTH. Pemanasan ini berfungsi untuk mempercepat terjadinya reaksi oksidasi kafein menjadi produk antara yang akan berikatan dengan MBTH menghasilkan produk berwarna biru. Akan tetapi, sebelum diaplikasikan, sampel minuman kopi perlu dipreparasi.

Preparasi sampel dilakukan untuk mengisolasi kafein dari senyawa lain yang dapat mengganggu penetapan kadar kafein. Preparasi dilakukan dengan metode fraksinasi cair-cair menggunakan pelarut air dan diklorometana. Diklorometana atau metilen klorida adalah salah satu pelarut organik yang dapat melarutkan kafein. Dibandingkan dengan kloroform dan etil asetat, kafein memiliki kelarutan yang tinggi dalam pelarut diklorometana (Vandepoosele dkk., 2021). Pada pengerjaannya, sampel minuman kopi akan dipanaskan dengan

25 ml akuades hingga mendidih kemudian dipindahkan ke dalam corong pisah. Setelah itu, ditambahkan 25 ml diklorometana dan dilakukan fraksinasi. Fraksinasi dilakukan sebanyak 4 kali untuk memastikan kafein pada sampel terisolasi secara maksimal (Belay dkk., 2008). Fungsi pemanasan menggunakan akuades adalah untuk memastikan kafein yang terkandung dalam kopi terlarut dalam air, sehingga dapat meminimalisir larutnya senyawa selain kafein larut dalam diklorometana. Fraksi diklorometana kemudian diuapkan dan dilarutkan dalam labu ukur 10 ml menggunakan akuades dan etanol.

Setelah dilakukan preparasi sampel, maka aplikasi metode skanometri pada sampel dapat dilakukan. Campuran reagen dan fraksi diklorometana didiamkan selama 20 menit untuk menunggu waktu respon. Setelah 20 menit, campuran reagen dan sampel *discan* dan dianalisis menggunakan program *ImageJ* untuk mendapatkan data intensitas warna *mean blue*. Nilai *mean blue* kemudian dimasukkan pada persamaan kurva baku untuk mendapatkan kadar kafein dalam sampel minuman kopi.

Setelah dilakukan penetapan kadar kafein dalam sampel menggunakan metode skanometri, dilanjutkan dengan penetapan kadar kafein dalam sampel menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis sebagai metode pembanding. Prosedur metode spektrofotometri UV-Vis diawali dengan memipet 0,5 ml sampel atau standar kafein kemudian ditambahkan 1 ml reagen NP dan 0,5 ml larutan asam asetat pada vial dan dipanaskan selama 2 menit di oven pada suhu 50°C. Setelah itu, ditambahkan 2 ml reagen MBTH dan didiamkan selama 20 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 630 nm (Singh dan Sahu, 2006).

Setelah didapatkan hasil pengukuran dari kedua metode, dilakukan analisis *independent t-test*. *T-test* adalah salah satu metode pengujian uji statistik parametrik. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan tingkat signifikansi 0,05. Kriteria penerimaan uji dilihat dari nilai signifikansi. Apabila nilai signifikansi lebih dari 0,05 maka hasil uji dinyatakan tidak berbeda bermakna.

Sebaliknya, apabila nilai signifikansi kurang dari 0,05 maka hasil uji dinyatakan berbeda bermakna (Magdalena dan Maria, 2019). Pada tabel 4.8 diketahui nilai signifikansi dari tiap sampel lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa metode skanometri dapat digunakan sebagai alternatif dalam penetapan kadar kafein.

Tabel 4.8 Hasil penetapan kadar kafein metode skanometri dan spektrofotometri UV-Vis (n=3, $\alpha=0,05$)

| Sampel Minuman Kopi | Skanometri (ppm \pm SD) | Spektrofotometri UV-Vis (ppm \pm SD) | Signifikansi |
|------------------------|------------------------------|--|--------------|
| A | 201,327 \pm 4,602 | 194,8 \pm 11,776 | 0,505 |
| B | 225,556 \pm 1,931 | 224,8 \pm 1,638 | 0,694 |
| C | 206,358 \pm 0,852 | 207,467 \pm 0,943 | 0,285 |
| D | 232,840 \pm 1,458 | 237,467 \pm 2,494 | 0,181 |
| E | 275,802 \pm 2,423 | 274,133 \pm 4,110 | 0,647 |

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan beberapa hal yaitu:

1. Kondisi optimum penggunaan metode skanometri untuk menentukan kadar kafein adalah:
 - a. Volume maksimal dalam sumuran lempeng mikro adalah 300 μ l.
 - b. Konsentrasi optimal reagen NP, MBTH dan larutan asam asetat masing-masing 0,01 M, 0,01 M dan 0,1 M.
 - c. Suhu pemanasan optimal yang digunakan adalah suhu 50°C.
 - d. Data intensitas warna yang digunakan adalah nilai *mean blue*.
2. Karakterisasi metode analisis:
 - a. Waktu respon metode skanometri adalah 20 menit.
 - b. Linearitas dilakukan dengan rentang konsentrasi 50 hingga 900 ppm dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,993.
 - c. Batas deteksi dan batas kuantifikasi metode skanometri masing-masing 36,4773 ppm dan 110,5374 ppm.
 - d. Penetapan kadar kafein menggunakan metode skanometri terganggu oleh asam tanat dengan rasio 1:4 dan asam klorogenat dengan rasio 1:2, 1:4 dan 1:8.
 - e. Presisi metode skanometri untuk standar kafein 500 ppm dan sampel E minuman kopi bernilai masing-masing 1,157% dan 1,971%.
 - f. Akurasi metode skanometri standar kafein 500 ppm dan sampel E minuman kopi dinyatakan dengan persentase perolehan kembali dengan nilai masing-masing 99,914% dan 98,470%.
 - g. Reagen yang digunakan pada metode skanometri stabil selama 150 menit jika disimpan pada suhu ruang (25°C) dan stabil selama 2 hari pada suhu lemari es (4°C).

3. Metode skanometri dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar kafein sampel kopi yang difraksinasi dalam diklorometana.

5.2 Saran

Pada penelitian “Penetapan Kadar Kafein Pada Berbagai Jenis Minuman Kopi Menggunakan Metode Skanometri” masih memiliki beberapa kekurangan sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Beberapa saran yang dapat diberikan adalah:

- a. Waktu pakai metode skanometri masih memerlukan waktu yang lama, sehingga perlu dilakukan pengembangan metode untuk menghasilkan waktu respon yang lebih cepat.
- b. Selektivitas pada penelitian ini tidak menggunakan perbandingan bobot analit dan interferen pada sampel asli, sehingga perlu dilakukan uji selektivitas menggunakan perbandingan bobot interferen dan analit pada sampel asli.

DAFTAR PUSTAKA

- Abderrahim, Mohamed, D. 2016. A novel high-throughput image based rapid folin-ciocalteau assay for assessment of reducing capacity in foods. *Talanta*. 152:82–89.
- Barcelos, R. P., F. D. Lima, N. R. Carvalho, G. Bresciani, dan L. F. Royes. 2020. Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. *Nutrition Research*. 80:1–17.
- Belay, A., K. Ture, M. Redi, dan A. Asfaw. 2008. Measurement of caffeine in coffee beans with uv/vis spectrometer. *Food Chemistry*. 108(1):310–315.
- Camargo, M. A. F. dan C. A. C. M. Camargo. 2019. Effects of caffeine on the organism—literature review. *OALib*. 06(03):1–7.
- Chu, Y. 2012. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. John Wiley & Sons, Inc. and the Institute of Food Technologists.
- Daul, L., T. Jin, I. Busch, dan L. Koenders. 2021. Influence of geometric properties of capacitive sensors on slope error and nonlinearity of displacement measurements. *Sensors*. 21(13)
- Depkes RI. 2020. *Farmakope Indonesia Edisi VI*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Ermer, J. E. dan P. Nethercote. 2015. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 1. *Nucl. Phys*.
- Farah, A. dan T. F. Dos Santos. 2015. *The Coffee Plant and Beans: An Introduction*. Elsevier Inc. *Coffee in Health and Disease Prevention*.
- FDA. 2018. Highly concentrated caffeine in dietary supplements: guidance for industry
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi dan cara penggunaannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3):117.

- Hidayat, M. A., F. Jannah, dan B. Kuswandi. 2016. Development of paper based sensor for the determination of total phenolic content in green tea beverages. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 9:424–430.
- Hidayat, M. A., N. Puspitaningtyas, A. A. Gani, dan B. Kuswandi. 2017. Rapid test for the determination of total phenolic content in brewed-filtered coffee using colorimetric paper. *Journal of Food Science and Technology*. 54(11):3384–3390.
- Huber, L. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*.
- Jafari, A., S. Naghshi, H. Shahinfar, S. O. Salehi, F. Kianny, M. Askari, P. J. Surkan, dan L. Azadbakht. 2022. Relationship between maternal caffeine and coffee intake and pregnancy loss: a grading of recommendations assessment, development, and evaluation-assessed, dose-response meta-analysis of observational studies. *Frontiers in Nutrition*. 9(August)
- Li, J., H. Zhao, J. M. Song, J. Zhang, Y. L. Tang, dan C. M. Xin. 2015. A meta-analysis of risk of pregnancy loss and caffeine and coffee consumption during pregnancy. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 130(2):116–122.
- Magdalena, R. dan A. K. Maria. 2019. Analisis penyebab dan solusi rekonsiliasi finished goods menggunakan hipotesis statistik dengan metode pengujian independent sample t-test di pt.merck, tbk. *Jurnal Tekno*. 16(2):35–48.
- Maramis, R. K., G. Citraningtyas, dan F. Wehantouw. 2013. Analisis kafein dalam kopi bubuk di kota manado menggunakan spektrofotometri uv-vis. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 2(4):122–128.
- Patay, É. B., T. Bencsik, dan N. Papp. 2016a. Phytochemical overview and medicinal importance of coffea species from the past until now. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 9(12):1127–1135.
- Patay, É. B., N. Sali, T. Koszegi, R. Csepregi, V. L. Balázs, T. S. Németh, T. Németh, dan N. Papp. 2016b. Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three coffea species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 9(4):366–371.

- Rhee, J., R. Kim, Y. Kim, M. Tam, Y. Lai, N. N. Keum, dan C. E. Oldenburg. 2015. Maternal caffeine consumption during pregnancy and risk of low birth weight: a dose-response meta-analysis of observational studies. *PLoS ONE*. 10(7):1–18.
- Richards, G. dan A. P. Smith. 2016. Caffeine consumption and general health in secondary school children: a cross-sectional and longitudinal analysis. *Frontiers in Nutrition*. 3(November):1–11.
- Sharma, H. 2020. A detail chemistry of coffee and its analysis. *Coffee - Production and Research*
- Shokrollahi, A., Z. Mohammadpour, dan A. Abbaspour. 2017. Colorimetric determination of free salicylic acid in aspirin and urine by scanometry as a new, reliable, inexpensive and simple method. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 51(4):324–329.
- Shrivastava, A. dan V. Gupta. 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*. 2(1):21.
- Singh, D. K. dan A. Sahu. 2006. Spectrophotometric determination of caffeine and theophylline in pure alkaloids and its application in pharmaceutical formulations. *Analytical Biochemistry*. 349(2):176–180.
- Sudalai, A., A. Khenkin, dan R. Neumann. 2015. Sodium periodate mediated oxidative transformations in organic synthesis. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 13(15):4374–4394.
- Temple, J. L., C. Bernard, S. E. Lipshultz, J. D. Czachor, J. A. Westphal, dan M. A. Mestre. 2017. The safety of ingested caffeine: a comprehensive review. *Frontiers in Psychiatry*. 8(May):1–19.
- USDA. 2021. USDA PLANTS Database. <https://plants.usda.gov/home%0Ahttps://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=ZIOF> [Diakses pada February 6, 2023].
- Vandepoosele, A., M. Draye, C. Piot, dan G. Chatel. 2021. Study of influential parameters of the caffeine extraction from spent coffee grounds: from brewing

coffee method to the waste treatment conditions. *Clean Technologies*. 3(2):335–350.

Vuong, Q. V. dan P. D. Roach. 2014. Caffeine in green tea: its removal and isolation. *Separation and Purification Reviews*. 43(2):155–174.

Wong, J. X. H., F. S. F. Liu, dan H. Z. Yu. 2014. Mobile app-based quantitative scanometric analysis. *Analytical Chemistry*. 86(24):11966–11971.

Yazid, E. A., Nuhmaan, dan M. R. Pratama. 2019. Analysis of caffeine in tablet dosage form with spectrophotometric and iodometric bac titration methods. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*. 4(6)

Zabot, G. L. 2019. *Decaffeination Using Supercritical Carbon Dioxide*. Elsevier Inc. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Supercritical Carbon Dioxide as Green Solvent*.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 4.1. Penentuan Intensitas Warna

1. Kanal *Red* (R)

| Konsentrasi (ppm) | <i>Mean blue</i> | | | Rerata | Δ <i>Mean blue</i> | SD |
|----------------------|------------------|----------------|----------------|---------|-------------------------------|-------|
| | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | | | |
| Blanko | 249,367 | 248,308 | 248,700 | 248,792 | - | 0,437 |
| 50 | 7,420 | 5,766 | 7,935 | 7,040 | 241,751 | 0,925 |
| 300 | 5,681 | 5,562 | 5,150 | 5,464 | 243,327 | 0,228 |
| 500 | 4,661 | 4,673 | 4,846 | 4,727 | 244,065 | 0,085 |
| 750 | 3,171 | 3,189 | 3,455 | 3,272 | 245,520 | 0,130 |
| 900 | 3,278 | 3,035 | 3,181 | 3,165 | 245,627 | 0,100 |

2. Kanal *Green* (G)

| Konsentrasi (ppm) | <i>Mean blue</i> | | | Rerata | Δ <i>Mean blue</i> | SD |
|----------------------|------------------|----------------|----------------|---------|-------------------------------|-------|
| | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | | | |
| Blanko | 247,62 | 247,908 | 248,02 | 247,849 | - | 0,168 |
| 50 | 81,136 | 81,618 | 82,382 | 81,712 | 166,137 | 0,513 |
| 300 | 81,136 | 81,618 | 82,382 | 81,712 | 166,137 | 0,513 |
| 500 | 81,63 | 79,532 | 83,035 | 81,399 | 166,450 | 1,439 |
| 750 | 78,79 | 79,507 | 80,262 | 79,520 | 168,330 | 0,601 |
| 900 | 77,771 | 79,507 | 77,962 | 78,413 | 169,436 | 0,777 |

3. Kanal *Blue* (B)

| Konsentrasi (ppm) | <i>Mean blue</i> | | | Rerata | Δ <i>Mean blue</i> | SD |
|----------------------|------------------|----------------|----------------|---------|-------------------------------|-------|
| | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | | | |
| Blanko | 249,367 | 248,308 | 248,700 | 248,792 | - | 0,437 |
| 50 | 7,420 | 5,766 | 7,935 | 7,040 | 241,751 | 0,925 |
| 300 | 5,681 | 5,562 | 5,15 | 5,464 | 243,327 | 0,228 |
| 500 | 4,661 | 4,673 | 4,846 | 4,727 | 244,065 | 0,085 |
| 750 | 3,171 | 3,189 | 3,455 | 3,272 | 245,520 | 0,130 |
| 900 | 3,278 | 3,035 | 3,181 | 3,165 | 245,627 | 0,100 |

4. Kanal *Red-Green-Blue* (RGB)

| Konsentrasi (ppm) | <i>Mean blue</i> | | | | Δ <i>Mean blue</i> | SD |
|----------------------|------------------|----------------|----------------|---------|---------------------------|-------|
| | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | Rerata | | |
| Blanko | 250,336 | 255,233 | 250,384 | 250,317 | - | 0,063 |
| 50 | 90,209 | 89,490 | 90,849 | 90,183 | 160,134 | 0,555 |
| 300 | 89,192 | 89,291 | 89,472 | 89,318 | 160,999 | 0,116 |
| 500 | 88,538 | 87,808 | 89,134 | 86,938 | 161,824 | 0,542 |
| 750 | 86,544 | 86,998 | 87,272 | 86,938 | 163,379 | 0,300 |
| 900 | 85,975 | 86,401 | 85,966 | 86,114 | 164,203 | 0,203 |

LAMPIRAN 4.2 Penentuan Suhu Pemanasan

1. Suhu 50°C

| Konsentrasi (ppm) | <i>Mean blue</i> | | | | Δ <i>Mean blue</i> | SD |
|----------------------|------------------|----------------|----------------|---------|---------------------------|-------|
| | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | Rerata | | |
| Blanko | 253,803 | 253,821 | 254,055 | 253,893 | - | 0.115 |
| 50 | 188,326 | 188,220 | 188,131 | 188,226 | 65,667 | 0.080 |
| 300 | 186,291 | 186,068 | 186,950 | 186,436 | 67,457 | 0.374 |
| 500 | 184,041 | 185,065 | 184,495 | 184,534 | 69,359 | 0.419 |
| 750 | 183,049 | 182,699 | 182,038 | 182,595 | 71,298 | 0.419 |
| 900 | 180,555 | 181,776 | 182,780 | 181,704 | 72,189 | 0.910 |

2. Suhu 60°C

| Konsentrasi (ppm) | <i>Mean blue</i> | | | | Δ <i>Mean blue</i> | SD |
|----------------------|------------------|----------------|----------------|---------|---------------------------|-------|
| | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | Rerata | | |
| Blanko | 250,478 | 250,018 | 250,731 | 250,409 | - | 0.295 |
| 50 | 180,244 | 181,906 | 180,692 | 180,947 | 69,462 | 0.702 |
| 300 | 179,852 | 179,852 | 179,505 | 179,736 | 70,673 | 0.164 |
| 500 | 178,625 | 178,127 | 178,575 | 178,442 | 71,967 | 0.224 |
| 750 | 177,507 | 177,684 | 178,326 | 177,839 | 72,570 | 0.352 |
| 900 | 177,396 | 176,778 | 176,523 | 176,899 | 73,510 | 0.367 |

3. Suhu 70°C

| Konsentrasi (ppm) | <i>Mean blue</i> | | | Rerata | Δ Mean <i>blue</i> | SD |
|----------------------|------------------|----------------|----------------|---------|------------------------------|-------|
| | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | | | |
| Blanko | 247,524 | 246,73 | 246,841 | 247,032 | - | 0.351 |
| 50 | 148,441 | 147,685 | 147,635 | 147,920 | 99,111 | 0.369 |
| 300 | 145,458 | 145,642 | 146,002 | 145,701 | 101,331 | 0.226 |
| 500 | 144,467 | 144,297 | 144,85 | 144,538 | 102,494 | 0.231 |
| 750 | 142,759 | 140,027 | 143,718 | 142,168 | 104,864 | 1.564 |
| 900 | 137,367 | 139,158 | 138,566 | 138,364 | 108,668 | 0.745 |

LAMPIRAN 4.3. Waktu Respon

| Waktu (menit) | Blanko | R1 | R2 | R3 | Rerata | Δ Mean <i>Blue</i> |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------------|
| 0 | 251,502 | 231,202 | 231,798 | 231,807 | 231,602 | 19,900 |
| 2 | 252,548 | 231,199 | 231,636 | 230,907 | 231,247 | 21,300 |
| 4 | 252,703 | 226,677 | 226,891 | 226,768 | 226,779 | 25,924 |
| 6 | 245,688 | 218,881 | 219,234 | 219,062 | 219,059 | 26,629 |
| 8 | 246,615 | 218,253 | 219,761 | 219,701 | 219,238 | 27,376 |
| 10 | 233,555 | 205,312 | 204,841 | 204,497 | 204,883 | 28,671 |
| 12 | 233,575 | 204,56 | 204,332 | 204,322 | 204,405 | 29,170 |
| 14 | 233,591 | 202,485 | 201,522 | 202,348 | 202,118 | 31,473 |
| 16 | 233,677 | 201,216 | 201,186 | 201,264 | 201,222 | 32,455 |
| 18 | 232,771 | 200,002 | 198,115 | 199,097 | 199,071 | 33,700 |
| 20 | 235,944 | 200,853 | 200,692 | 200,749 | 200,765 | 35,179 |
| 22 | 236,327 | 201,131 | 201,117 | 201,122 | 201,123 | 35,204 |
| 24 | 236,203 | 200,506 | 200,503 | 200,504 | 200,504 | 35,699 |
| 26 | 236,175 | 200,744 | 200,827 | 200,699 | 200,757 | 35,418 |
| 28 | 236,191 | 200,88 | 200,842 | 200,452 | 200,725 | 35,466 |
| 30 | 236,220 | 200,688 | 200,957 | 201,279 | 200,975 | 35,245 |
| 32 | 236,294 | 200,763 | 200,885 | 201,431 | 201,026 | 35,268 |
| 34 | 236,351 | 200,991 | 201,019 | 201,628 | 201,213 | 35,138 |
| 36 | 236,319 | 200,993 | 201,023 | 201,615 | 201,210 | 35,109 |
| 38 | 247,327 | 212,136 | 212,527 | 211,694 | 212,119 | 35,208 |
| 40 | 247,467 | 212,102 | 212,693 | 212,115 | 212,303 | 35,164 |
| 42 | 247,674 | 212,987 | 212,879 | 212,968 | 212,945 | 34,729 |

LAMPIRAN 4.4. Linearitas

| Konsentrasi (ppm) | <i>Mean blue</i> | | | Rerata | Δ Mean <i>blue</i> | SD |
|----------------------|------------------|----------------|----------------|---------|------------------------------|-------|
| | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | | | |
| Blanko | 254,076 | 254,303 | 254,377 | 254,252 | - | 0,128 |
| 50 | 183,959 | 180,364 | 182,641 | 182,321 | 71,931 | 1,484 |
| 300 | 181,582 | 182,817 | 180,308 | 181,569 | 71,293 | 1,024 |
| 500 | 178,369 | 181,492 | 182,986 | 180,949 | 72,683 | 1,923 |
| 750 | 179,016 | 180,431 | 181,119 | 180,189 | 73,303 | 0,875 |
| 900 | 178,967 | 181,308 | 179,153 | 179,809 | 74,063 | 1,062 |

LAMPIRAN 4.5. Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi (LOD dan LOQ)

Persamaan regresi untuk perhitungan nilai LOD dan LOQ: $y = 0,003x + 71,793$

| a | b | Konsentrasi (ppm) | Y | Y1 | Y-Y1 | (Y-Y1) ² |
|--------|-------|----------------------|--------|--------|-----------|---------------------|
| 71,793 | 0,003 | 50 | 71,931 | 71,943 | -0,0123 | 0,0002 |
| 71,793 | 0,003 | 300 | 72,683 | 72,693 | -0,0100 | 0,0001 |
| 71,793 | 0,003 | 500 | 73,303 | 73,293 | 0,0100 | 0,0001 |
| 71,793 | 0,003 | 750 | 74,063 | 74,043 | 0,0203 | 0,0004 |
| 71,793 | 0,003 | 900 | 74,443 | 74,493 | -0,0503 | 0,0025 |
| | | | | | Rata-Rata | 0,0033 |
| | | | | | Sy | 0,0332 |
| | | | | | LOD | 36,4773 |
| | | | | | LOQ | 110,2374 |

Perhitungan LOD dan LOQ

$$S_y = \sqrt{\frac{(Y - Y1)^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{0,0033}{3}} = 0,0332$$

$$LOD = \frac{(3,3 \times S_y)}{b} = \frac{(3,3 \times 0,0332)}{0,003} = 36,4773 \text{ ppm}$$

$$LOQ = \frac{(10 \times S_y)}{b} = \frac{(10 \times 0,0332)}{0,003} = 110,2374 \text{ ppm}$$

LAMPIRAN 4.6. Presisi

Persamaan regresi kurva baku presisi: $y=0,0068x + 74,393$

Presisi Standar Kafein 500 ppm

| | <i>Mean Blue</i> | Δ <i>Mean Blue</i> | b | a | Konsentrasi (ppm) |
|-------------|------------------|---------------------------|----------|----------|--------------------------|
| Blanko | 254,458 | - | - | - | |
| Replikasi 1 | 175,621 | 78,837 | 0,0068 | 74,393 | 522,843 |
| Replikasi 2 | 175,690 | 78,768 | 0,0068 | 74,393 | 514,755 |
| Replikasi 3 | 175,655 | 78,803 | 0,0068 | 74,393 | 518,873 |
| Replikasi 4 | 175,609 | 78,849 | 0,0068 | 74,393 | 524,167 |
| Replikasi 5 | 175,663 | 78,795 | 0,0068 | 74,393 | 517,990 |
| Replikasi 6 | 175,530 | 78,928 | 0,0068 | 74,393 | 533,578 |
| | | | | Rerata | 652,549 |
| | | | | SD | 7,549 |
| | | | | RSD (%) | 1,157 |

Presisi Sampel E Minuman Kopi

| | <i>Mean Blue</i> | Δ <i>Mean Blue</i> | b | a | Konsentrasi (ppm) |
|-------------|------------------|---------------------------|----------|----------|--------------------------|
| Blanko | 254,458 | - | - | - | |
| Replikasi 1 | 178,150 | 76,308 | 0,0068 | 74,393 | 281,667 |
| Replikasi 2 | 178,230 | 76,228 | 0,0068 | 74,393 | 269,902 |
| Replikasi 3 | 178,179 | 76,279 | 0,0068 | 74,393 | 277,402 |
| Replikasi 4 | 178,226 | 76,232 | 0,0068 | 74,393 | 270,490 |
| Replikasi 5 | 178,197 | 76,261 | 0,0068 | 74,393 | 274,755 |
| Replikasi 6 | 178,262 | 76,196 | 0,0068 | 74,393 | 265,196 |
| | | | | Rerata | 273,235 |
| | | | | SD | 5,386 |
| | | | | RSD (%) | 178,150 |

LAMPIRAN 4.7. Akurasi

Persamaan regresi kurva baku akurasi: $y = 0,0064x + 64,31$

Akurasi Standar Kafein 500 ppm

| Adisi | Mean Blue | ΔMean Blue | Konsentrasi (ppm) | Berat kafein (mg) | %perolehan kembali | Rerata |
|--------------|------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|
| 30 | 178,119 | 68,477 | 651,094 | 6,511 | 100,168 | 99,914 |
| | 178,059 | 68,537 | 660,469 | 6,605 | 101,611 | |
| | 178,088 | 68,508 | 655,938 | 6,559 | 100,913 | |
| 45 | 177,769 | 68,827 | 705,781 | 7,058 | 97,349 | |
| | 177,896 | 68,700 | 685,938 | 6,859 | 94,612 | |
| | 177,510 | 69,086 | 746,250 | 7,463 | 102,931 | |
| 60 | 177,156 | 69,440 | 801,562 | 8,016 | 100,195 | |
| | 177,224 | 69,372 | 790,938 | 7,909 | 98,867 | |
| | 177,034 | 69,562 | 820,625 | 8,206 | 102,578 | |

Akurasi Sampel A Minuman Kopi

| Adisi | Mean Blue | ΔMean Blue | Konsentrasi (ppm) | Berat Kafein (mg) | %perolehan kembali | Rerata |
|--------------|------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|
| 30 | 179,666 | 66,930 | 409,375 | 4,094 | 99,363 | 98,468 |
| | 179,643 | 66,953 | 412,969 | 4,130 | 100,235 | |
| | 179,833 | 66,763 | 383,281 | 3,833 | 93,029 | |
| 45 | 179,378 | 67,218 | 454,375 | 4,544 | 100,326 | |
| | 179,419 | 67,177 | 447,969 | 4,480 | 98,911 | |
| | 179,457 | 67,139 | 442,031 | 4,420 | 97,600 | |
| 60 | 179,134 | 67,462 | 492,500 | 4,925 | 99,717 | |
| | 179,163 | 67,433 | 487,969 | 4,880 | 98,799 | |
| | 179,181 | 67,415 | 485,156 | 4,852 | 98,230 | |

Perhitungan adisi

a. Adisi standar kafein 500 ppm

- Adisi 30%
 $30\% \times 5 \text{ mg} = 1,5 \text{ mg} \rightarrow$ total standar kafein yang dibutuhkan adalah 6,5 mg
 Pembuatan larutan adisi 30% \rightarrow ditimbang 6,5 mg standar kafein kemudian ditambahkan aquadest ad 10 ml hingga tanda batas pada labu ukur 10 ml.
- Adisi 45%
 $45\% \times 5 \text{ mg} = 2,25 \text{ mg} \rightarrow$ total standar kafein yang dibutuhkan adalah 7,25 mg
 Pembuatan larutan adisi 45% \rightarrow ditimbang 7,25 mg standar kafein kemudian ditambahkan aquadest ad 10 ml hingga tanda batas pada labu ukur 10 ml.
- Adisi 60%
 $60\% \times 5 \text{ mg} = 3 \text{ mg} \rightarrow$ total standar kafein yang dibutuhkan adalah 8 mg
 Pembuatan larutan adisi 60% \rightarrow ditimbang 8 mg standar kafein kemudian ditambahkan aquadest ad 10 ml hingga tanda batas pada labu ukur 10 ml.

b. Adisi sampel E minuman kopi

Dari hasil presisi didapatkan konsentrasi kafein pada sampel E minuman kopi adalah 273,235 ppm

- Adisi 30%
 $30\% \times 273,235 \text{ ppm} = 81,9705 \text{ ppm} (0,82 \text{ mg})$
 Pembuatan larutan adisi 30% \rightarrow ditimbang 3,3 mg sampel kemudian ditambahkan 0,82 mg standar kafein kemudian dilarutkan dengan aquadest ad 10 ml hingga tanda batas pada labu ukur 10 ml.
- Adisi 45%
 $45\% \times 273,235 \text{ ppm} = 122,95575 \text{ ppm} (1,229 \text{ mg})$
 Pembuatan larutan adisi 45% \rightarrow ditimbang 3,3 mg sampel kemudian ditambahkan 1,229 mg standar kafein kemudian dilarutkan dengan aquadest ad 10 ml hingga tanda batas pada labu ukur 10 ml.
- Adisi 60%
 $60\% \times 273,235 \text{ ppm} = 163,941 \text{ ppm} (1,639 \text{ mg})$
 Pembuatan larutan adisi 60% \rightarrow ditimbang 3,3 mg sampel kemudian ditambahkan 1,639 mg standar kafein kemudian dilarutkan dengan aquadest ad 10 ml hingga tanda batas pada labu ukur 10 ml.

LAMPIRAN 4.8. Interferensi

| Interferen | Bobot | <i>Mean blue</i> | Rerata | Δ <i>Mean blue</i> | Konsentrasi (ppm) | Massa (mg) | %interferensi |
|-------------------|--------------|------------------|---------------|---------------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|
| Asam Tanat | 4 | 178,003 | 178,096 | 49,784 | 526,855 | 5,269 | 5,371 |
| | | 178,400 | | | | | |
| | 2 | 177,886 | 178,157 | 49,723 | 521,250 | 5,213 | 4,250 |
| | | 178,268 | | | | | |
| | | 178,364 | | | | | |
| | | 177,838 | | | | | |
| 1 | 178,945 | 178,253 | 49,627 | 512,555 | 5,126 | 2,511 | |
| | 178,125 | | | | | | |
| Asam Klorogenat | 8 | 177,689 | 55,741 | 172,139 | 11650,000 | 116,500 | 22,300 |
| | | 55,959 | | | | | |
| | 4 | 55,406 | 78,506 | 149,375 | 7919,000 | 79,190 | 14,838 |
| | | 55,857 | | | | | |
| | | 78,444 | | | | | |
| | | 78,631 | | | | | |
| 2 | 96,846 | 96,782 | 131,098 | 9580,500 | 95,805 | 18,161 | |
| | 96,723 | | | | | | |
| | | 96,778 | | | | | |

LAMPIRAN 4.9. Waktu Pakai (Stabilitas)

a. Stabilitas pada suhu ruang (25°C)

| Waktu (menit) | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | Rerata | % penurunan <i>Mean Blue</i> |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------------------|
| 30 | 179,327 | 180,408 | 182,025 | 180,587 | 2,219 |
| 60 | 176,679 | 176,593 | 176,468 | 176,580 | 6,065 |
| 90 | 169,601 | 169,683 | 169,621 | 169,635 | 7,716 |
| 120 | 166,665 | 166,594 | 166,699 | 166,653 | 11,635 |
| 150 | 159,193 | 159,731 | 159,803 | 159,576 | 13,844 |
| 180 | 155,493 | 155,393 | 155,871 | 155,586 | 16,028 |
| 210 | 151,891 | 151,577 | 151,460 | 151,643 | 17,637 |

b. Stabilitas pada suhu lemari es (4°C)

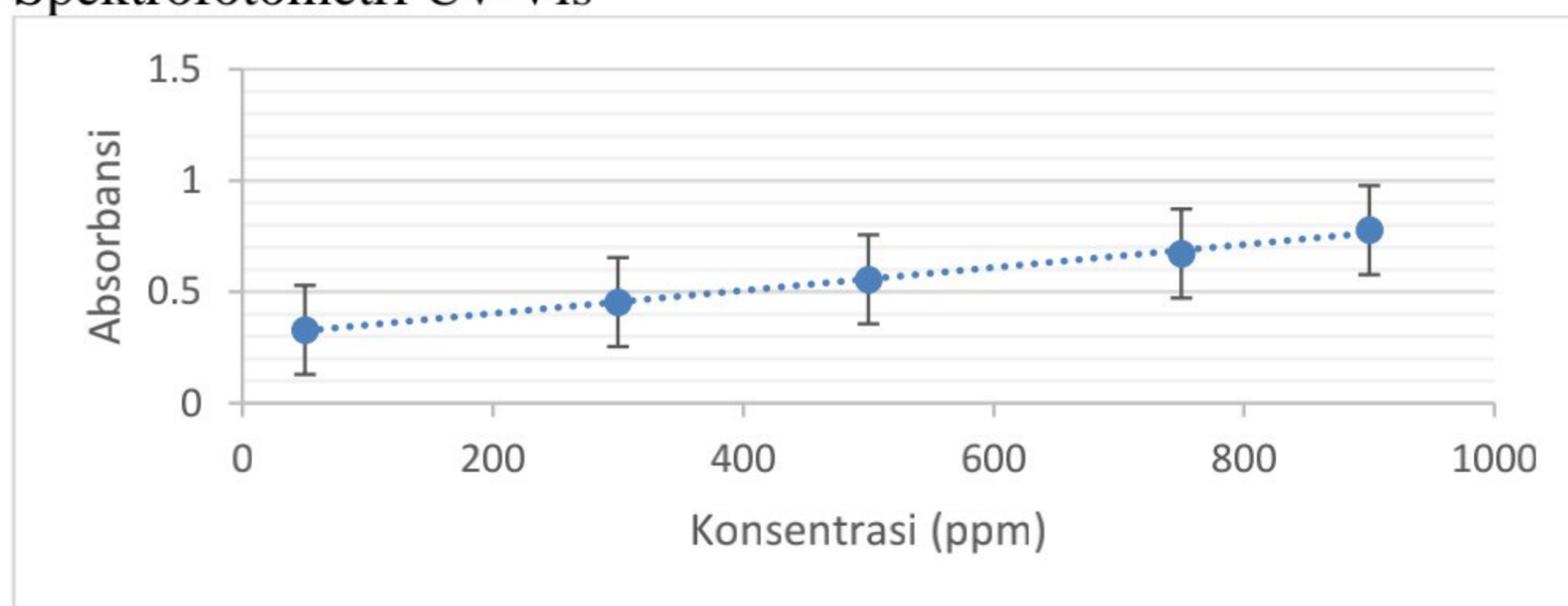
| Waktu (hari) | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | Rerata | %penurunan <i>Mean Blue</i> |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------------|
| 1 | 182,269 | 180,587 | 182,980 | 181,945 | 0 |
| 2 | 160,111 | 159,898 | 161,246 | 160,418 | 11,831 |
| 3 | 150,058 | 148,960 | 152,476 | 150,498 | 17,284 |
| 4 | 139,187 | 141,442 | 140,309 | 140,313 | 22,882 |
| 5 | 122,260 | 120,853 | 121,380 | 121,380 | 33,287 |
| 6 | 102,453 | 101,427 | 101,662 | 101,662 | 44,125 |
| 7 | 91,788 | 93,097 | 91,506 | 91,506 | 49,707 |

LAMPIRAN 4.10. Aplikasi Pada Sampel

a. Skanometri

| Sampel Minuman Kopi | Mean Blue | Mean Blue Blanko | Δ Mean Blue | Konsentrasi (ppm) |
|---------------------------|-----------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| A | 180,097 | 254,094 | 73,997 | 207,747 |
| | 180,191 | 254,094 | 73,903 | 199,043 |
| | 180,211 | 254,094 | 73,883 | 197,191 |
| B | 179,931 | 254,094 | 74,163 | 223,117 |
| | 179,903 | 254,094 | 74,191 | 225,710 |
| | 179,880 | 254,094 | 74,214 | 227,840 |
| C | 180,118 | 254,094 | 73,976 | 205,802 |
| | 180,119 | 254,094 | 73,975 | 205,710 |
| | 180,099 | 254,094 | 73,995 | 207,562 |
| D | 179,848 | 254,094 | 74,246 | 230,802 |
| | 179,818 | 254,094 | 74,276 | 233,580 |
| | 179,812 | 254,094 | 74,282 | 234,136 |
| E | 179,343 | 254,094 | 74,751 | 277,562 |
| | 179,344 | 254,094 | 74,750 | 277,469 |
| | 179,399 | 254,094 | 74,695 | 272,377 |

b. Spektrofotometri Uv-Vis



Persamaan regresi kurva baku: $y = 0,005x + 0,2996$

| Konsentrasi (ppm) | Absorbansi |
|-------------------|------------|
| 50 | 0,329 |
| 300 | 0,454 |
| 500 | 0,556 |
| 750 | 0,672 |
| 900 | 0,777 |

| Sampel Minuman Kopi | Absorbansi | Konsentrasi (ppm) |
|------------------------|------------|-------------------|
| | 0,403 | 206,8 |
| A | 0,399 | 198,8 |
| | 0,389 | 178,8 |
| | 0,411 | 222,8 |
| B | 0,412 | 224,8 |
| | 0,413 | 226,8 |
| | 0,403 | 206,8 |
| C | 0,404 | 208,8 |
| | 0,403 | 206,8 |
| | 0,420 | 240,8 |
| D | 0,418 | 236,8 |
| | 0,417 | 234,8 |
| | 0,437 | 274,8 |
| E | 0,439 | 278,8 |
| | 0,434 | 268,8 |

c. Hasil Uji T Bebas

1. Sampel A

| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| Mean | 194,8 | 201,3272 |
| Variance | 208 | 31,76726 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pooled Variance | 119,8836 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 4 | |
| t Stat | -0,73011 | |
| P(T<=t) one-tail | 0,252891 | |
| t Critical one-tail | 2,131847 | |
| P(T<=t) two-tail | 0,505781 | |
| t Critical two-tail | 2,776445 | |

2. Sampel B

| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|------------------------------|-------------------|-------------------|
| Mean | 224,8 | 225,5556 |
| Variance | 4 | 5,592707 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pooled Variance | 4,796353 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 4 | |
| t Stat | -0,42253 | |
| P(T<=t) one-tail | 0,347181 | |
| t Critical one-tail | 2,131847 | |
| P(T<=t) two-tail | 0,694363 | |
| t Critical two-tail | 2,776445 | |

3. Sampel C

| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|------------------------------|-------------------|-------------------|
| Mean | 207,4667 | 206,358 |
| Variance | 1,333333 | 1,08882 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pooled Variance | 1,211077 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 4 | |
| t Stat | 1,233818 | |
| P(T<=t) one-tail | 0,142405 | |
| t Critical one-tail | 2,131847 | |
| P(T<=t) two-tail | 0,28481 | |
| t Critical two-tail | 2,776445 | |

4. Sampel D

| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|------------------------------|-------------------|-------------------|
| Mean | 237,4667 | 232,8395 |
| Variance | 21,33333 | 3,1893 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pooled Variance | 12,26132 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 4 | |
| t Stat | 1,618421 | |
| P(T<=t) one-tail | 0,090441 | |
| t Critical one-tail | 2,131847 | |
| P(T<=t) two-tail | 0,180883 | |
| t Critical two-tail | 2,776445 | |

5. Sampel E

| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|------------------------------|-------------------|-------------------|
| Mean | 274,1333 | 275,8025 |
| Variance | 25,33333 | 8,80487 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pooled Variance | 17,0691 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 4 | |
| t Stat | -0,4948 | |
| P(T<=t) one-tail | 0,323342 | |
| t Critical one-tail | 2,131847 | |
| P(T<=t) two-tail | 0,646685 | |
| t Critical two-tail | 2,776445 | |