

Pengembangan Sensor Kimia Berbasis Kertas Untuk Penetapan Kadar Kafein Sampel Kopi

Mochammad Amrun Hidayat*, Noviani Tri Wahyuning, Indah Yulia Ningsih, and Bambang Kuswandi

Fakultas Farmasi Universitas Jember, Kalimantan I/2, Kampus Tegalboto, Jember ,Indonesia

Corresponding Author:

Mochammad Amrun Hidayat
amrun.farmasi@unej.ac.id

Received: October 2022

Accepted: February 2023

Published: March 2023

©Mochammad Amrun Hidayat et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

The caffeine chemical sensor was developed by co-immobilizing sodium periodate (NaIO_4), 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH), and acetic acid (CH_3COOH) onto paper by using an adsorption technique. The addition of caffeine solution could change the color of the sensor from white to pale blue which can be then captured by using a flatbed scanner and quantified by the ImageJ program, known as a scanometric technique. Method validation such as linearity, LOD, LOQ, precision, and accuracy of the sensor was done by using caffeine standards. The result of caffeine analysis using the developed chemical sensor-scanometric method agreed with that of the spectrophotometric method, suggesting that the developed sensor with scanometric technique can be used as an alternative method for caffeine assay in coffee samples.

Keywords: *Chemical sensor; NaIO_4 ; MBTH; CH_3COOH ; caffeine; scanometric*

Pendahuluan

Selain memiliki nilai ekonomi yang tinggi, kopi ternyata memiliki berbagai efek farmakologi, diantaranya: menurunkan resiko penyakit diabetes, menurunkan resiko penyakit Parkinson serta meningkatkan kewaspadaan (*alertness*) dan suasana hati (*mood*)^[1]. Meski demikian, konsumsi kopi berlebihan memberikan dampak buruk bagi kesehatan. Kopi diketahui dapat meningkatkan tekanan darah jangka pendek, lipodensity protein (LDL) dan risiko penyakit jantung^[2]. Efek farmakologi kopi tersebut terkait erat dengan kandungan alkaloid utama kopi yakni kafein^[3].

Pemerintah melalui Badan Pengawasan Obat dan Makanan (POM) dan Badan Standarisasi

Nasional (BSN) telah mengatur secara ketat kadar kafein dalam sampel kopi (biji, ekstrak dan minuman). Badan POM menetapkan kadar kafein kopi bubuk tidak lebih dari 2%, sedangkan kadar kafein kopi instan berkisar 2-8%. Kadar kafein kopi dekafein ditetapkan tidak lebih dari 1 g/kg, sedangkan kopi instan dekafein tidak lebih dari 3 g/kg. Kadar kafein minuman kopi ditetapkan tidak kurang dari 250 mg/kg. Minuman serbuk kopi gula, serbuk kopi gula susu dan serbuk kopi gula krimer kadar kafein ditetapkan dalam rentang 1500-6000 mg/kg^[4]. BSN telah menetapkan kadar kafein dalam sampel kopi melalui berbagai Standar Nasional Indonesia (SNI) untuk kopi. Kadar kafein kopi bubuk ditetapkan berkisar 0,45-2% b/b^[5]. Kadar kopi gula krimer dalam

kemasan ditetapkan berkisar 1500-6000 mg/kg^[6]. Kadar kafein kopi instan ditetapkan minimal 2,5%, sedangkan kadar kafein kopi instan dekafein maksimal 0,3%^[7].

Berbagai metode analisis dikembangkan untuk mendeteksi kafein di dalam kopi, misalnya dengan teknik spektroskopi atau kromatografi. Metode spektrofotometri UV-Vis banyak digunakan untuk mendeteksi kafein di dalam kopi atau produk minuman yang mengandung kafein^{[8]-[10]}. Metode kromatografi yang paling banyak digunakan adalah *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Metode HPLC telah digunakan untuk mendeteksi kafein di dalam kopi^{[11]-[13]}. Namun demikian, metode spektrometri dan kromatografi memiliki beberapa kelemahan, yakni: membutuhkan peralatan yang mahal, volume sampel yang besar, waktu analisis yang relatif lama, serta analisis harus memiliki pengetahuan dan keterampilan kimia analisis yang memadai. Oleh karenanya dibutuhkan alternatif metode analisis kafein kopi yang cepat, tepat, murah dan mudah sehingga bisa dioperasikan oleh orang awam sekalipun.

Pengembangan metode analisis kafein secara kolorimetri dapat dilakukan melalui fabrikasi sensor kimia berbasis reagen kimia yang sensitif terhadap keberadaan kafein seperti senyawa fluorofor 8-hidroksipirena-1,3,6-trisulfonat (HPTS)^[14] menggunakan spektrofotometer serat optik^[15]. Selain itu, sensor kafein berbasis kolorimetri ini dapat dikembangkan menggunakan oksidator NaIO₄, asam asetat (CH₃COOH) dan kromogen MBTH yang sebelumnya digunakan pada metode spektrofotometri^{[16],[17]}. NaIO₄ dapat mengoksidasi kafein pada suasana sedikit asam membentuk oksida kafein. Selanjutnya, oksida kafein ini bereaksi dengan MBTH membentuk senyawa kompleks berwarna biru. Intensitas warna biru ini sebanding dengan jumlah kafein. Meski demikian, sensor kimia metode kolorimetri menggunakan reagen tersebut belum pernah dikembangkan.

Sensor kimia difabrikasi dengan mengimobilisasi reagen (NaIO₄, CH₃COOH dan MBTH) pada matriks pendukung kertas.

Penambahan larutan analit pada sensor akan mengubah warna sensor yang semula putih menjadi biru. Perubahan warna sensor ini ditangkap dengan pemindai dokumen (*flatbed scanner*) dan dikuantifikasi dengan bantuan program pengukur piksel (*pixel*) warna seperti ImageJ yang dikenal sebagai metode skanometri^{[18]-[20]}. Metode skanometri sebagai bagian dari metode kolorimetri lebih ekonomis daripada metode kolorimetri umum yang menggunakan instrumen spektrofotometer atau spektrofotometer.

Metodologi Penelitian

Bahan kimia

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah NaIO₄, MBTH dan CH₃COOH dari Sigma Aldrich® (USA) dengan kualitas analisis (*analytical grade*). Air untuk pelarut zat kimia menggunakan *aqua pro injection*. Kertas saring Whatman No. 1 (USA) diameter 12 cm digunakan sebagai matriks sensor. Tinta karet kualitas tekstil (Sunrise, Indonesia) digunakan untuk membuat pola lingkaran sensor.

Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: neraca analitik, seperangkat alat gelas (labu ukur, pipet volume, pengaduk, *beaker*), pipet mikro, *vortex mixer*, *sentrifuger*, *stopwatch*, *flatbed scanner* (Canon LiDE 120, Japan) dan Spektrofotometer UV-Vis (U-1800, Hitachi, Japan).

Prosedur penelitian

Fabrikasi sensor

Fabrikasi sensor dilakukan dengan membuat pola lingkaran dengan diameter internal ± 7 mm sebagai zona penginderaan (*sensing zone*) dengan matriks 7x10 menggunakan tinta karet dengan teknik screen printing pada matriks pendukung kertas Whatman No. 1^{[19]-[21]}. Selanjutnya, dilakukan imobilisasi larutan NaIO₄ 0,05 M, CH₃COOH 0.1 M dan MBTH 0,05 M dengan teknik adsorpsi pada zona penginderaan atau zona deteksi sensor (volume tiap larutan 0,5 μ L). Sensor kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan

pada suhu kamar ($\pm 25^\circ\text{C}$). Selanjutnya, sensor kimia disimpan dalam wadah tertutup dan terlindung dari cahaya pada suhu dingin ($\pm 5^\circ\text{C}$).

Karakterisasi analisis sensor

Karakterisasi analisis (validasi metode) menggunakan larutan standar kafein (100-500 ppm) meliputi: waktu respon, linieritas, batas deteksi (*LOD*) dan batas kuantitasi (*LOQ*), presisi, akurasi dan selektifitas dilakukan terhadap sensor kimia.

Aplikasi sensor kimia pada sampel kopi

Pada tahapan ini diawali dengan preparasi sampel biji kopi. Sebanyak 50 mg serbuk kering sampel kopi diekstraksi dengan 25 mL *aquadest* panas menggunakan teknik digesti pada suhu 90°C selama 30 menit. Selanjutnya cairan kopi ini disaring dengan menggunakan corong *Buchner*. Filtrat yang diperoleh kemudian dikocok dengan diklorometana (rasio volume 1:1) menggunakan *vortex mixer* dengan kecepatan 100 rpm selama 3 menit untuk mendapatkan fraksi diklorometana. Pengukuran kadar kafein dilakukan dengan mencampur 1.5 μL fraksi diklorometana, 0.5 μL larutan NaIO_4 dan 0,5 μL larutan CH_3COOH menggunakan *vortex mixer* dengan kecepatan 50 rpm selama 2 menit. Campuran ini

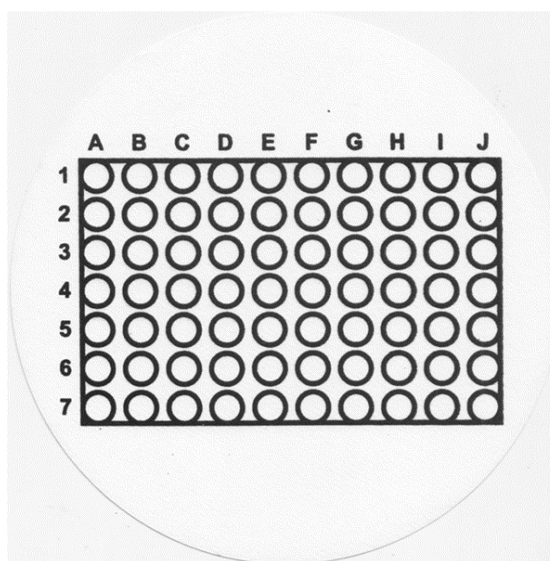
kemudian ditambahkan pada sensor dan didiamkan hingga kering. Selanjutnya, 0,5 μL larutan MBTH ditambahkan pada sensor dan dianalisis menggunakan metode skanometri. Kadar kafein sampel dihitung dengan cara memasukkan nilai intensitas warna larutan sampel ke dalam kurva linieritas larutan standar kafein (100-500 ppm).

Hasil analisis kafein menggunakan sensor (metode skanometri) selanjutnya dibandingkan dengan hasil yang diperoleh dengan metode standar^[16] (metode spektrofotometri) secara statistik menggunakan uji *t* bebas (*independent t test*).

Hasil dan Diskusi

Fabrikasi sensor kimia

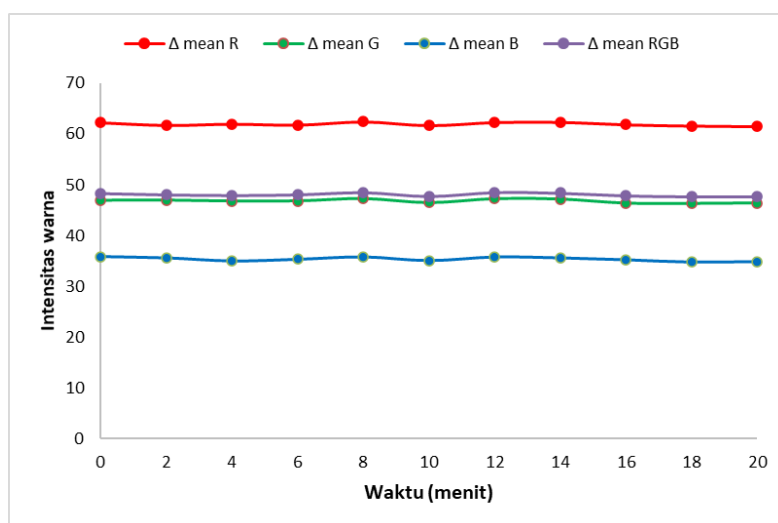
Desain sensor kimia berupa sumuran mikro dua dimensi ini (Gambar 1) telah dikembangkan sebelumnya^{[19]-[21]}. Berbeda dengan *microwell plate*, desain sensor ini memiliki zona deteksi berupa lingkaran pembatas yang terbuat dari pasta karet yang berfungsi sebagai pembatas hidrofob untuk cairan yang diserap pada zona deteksi. Volume serap zona deteksi ini berkisar 2-4 μL yang jauh lebih kecil daripada volume sumuran mikro ($\pm 300 \mu\text{L}$).



Gambar 1. Sensor kimia kafein berupa zona mikro pada kertas saring.



Gambar 2. Profil perubahan warna sensor sebelum (A1-A3) dan sesudah (B1-B3) penambahan larutan kafein 300 ppm ($n = 3$).



Gambar 3. Grafik intensitas warna biru sensor terhadap waktu ($n = 4$).

Mekanisme penginderaan

Reaksi oksidasi kafein oleh NaIO_4 yang menghasilkan oksida-kafein yang bereaksi dengan kromogen MBTH pada suasana sedikit asam menjadi dasar mekanisme penginderaan sensor kafein^[16]. Pada penambahan larutan kafein 300 ppm, sensor yang berwarna putih berubah menjadi biru seperti yang terlihat pada Gambar 2.

Karakterisasi analisis sensor

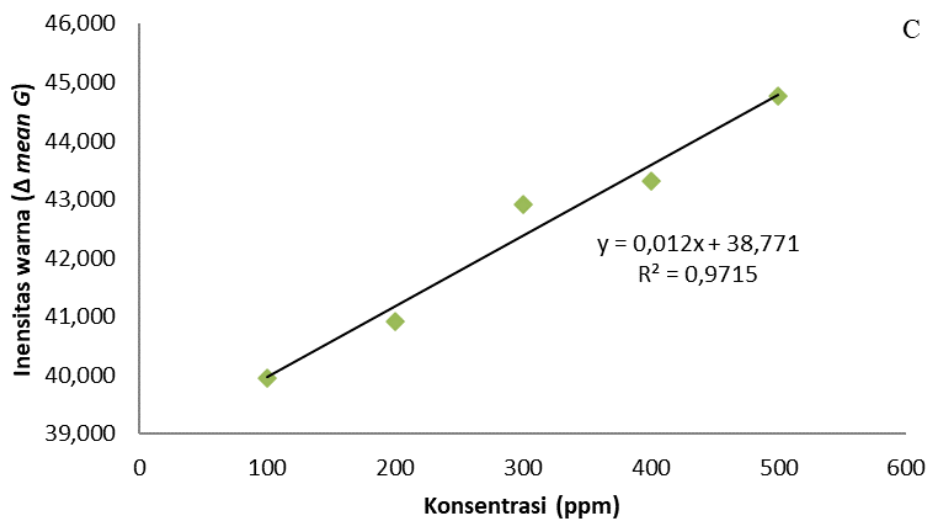
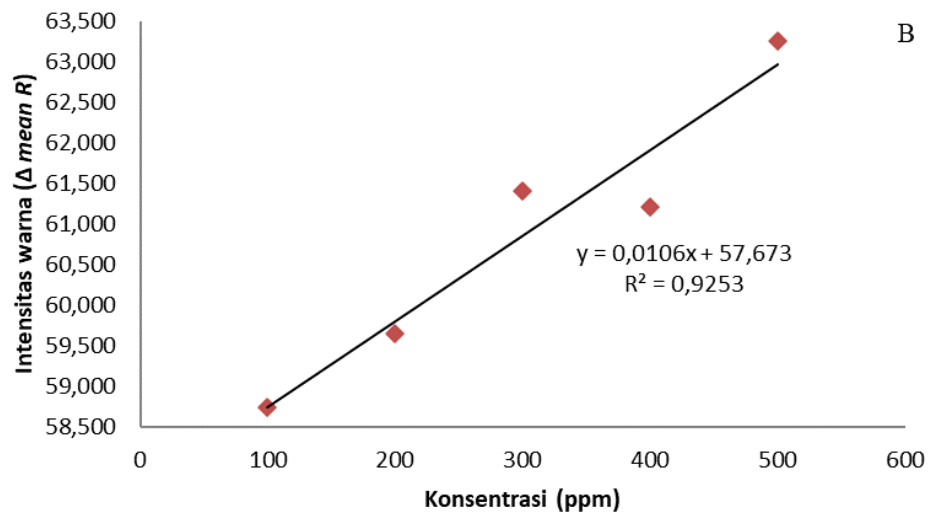
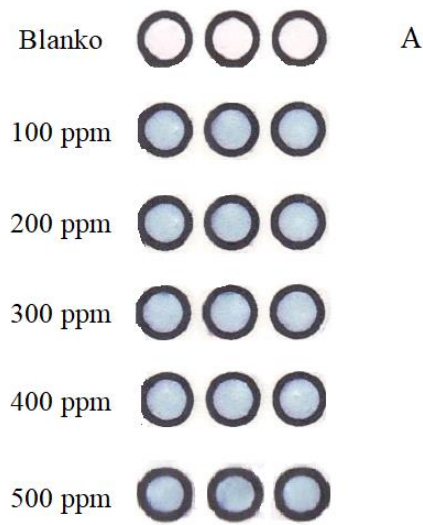
Penentuan waktu respon

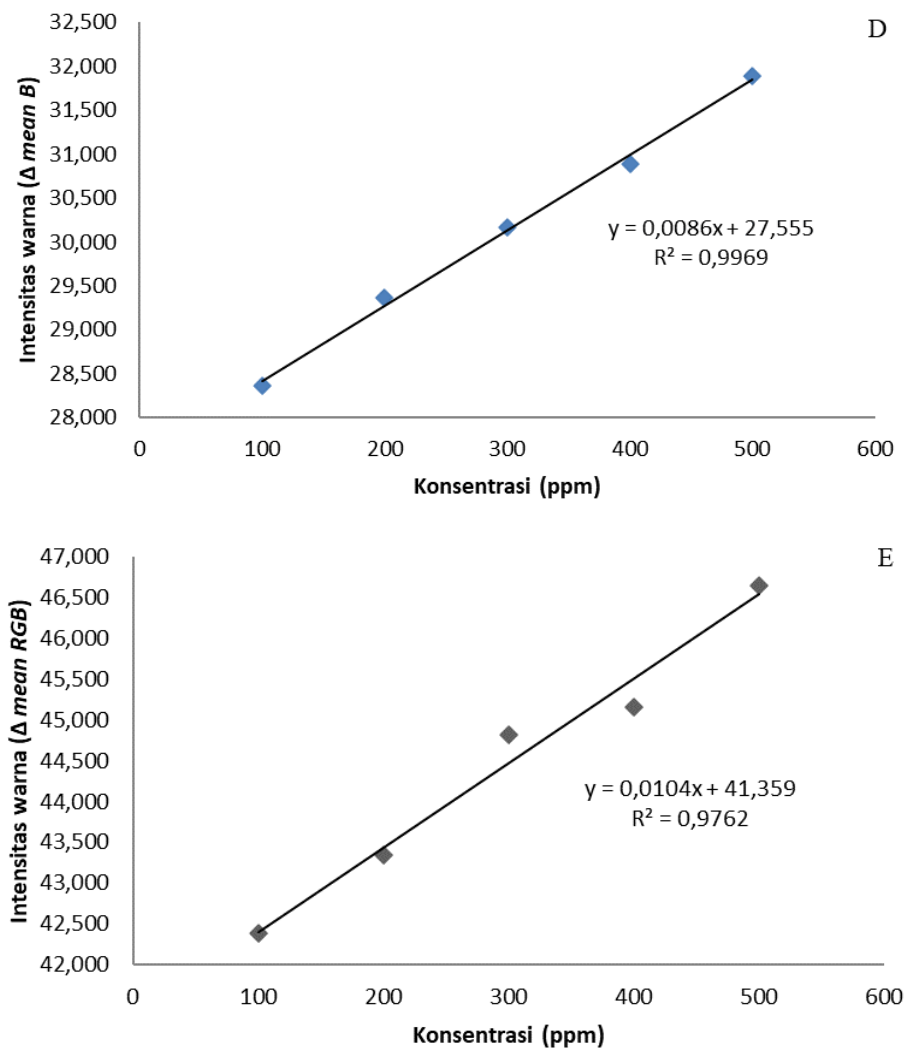
Penentuan waktu respon dilakukan dengan mengamati profil intensitas warna sensor pada penambahan larutan kafein (300 ppm) selama rentang 0-20 menit dengan interval 2 menit setiap pengukuran intensitas warna merah ($\Delta \text{mean R}$), hijau ($\Delta \text{mean G}$), biru ($\Delta \text{mean B}$) dan merah-hijau-biru ($\Delta \text{mean RGB}$). Pada Gambar 3

terlihat intensitas warna sensor relatif konstan dalam rentang waktu 12-20 menit, sehingga waktu respon ditetapkan pada menit ke-12. Oleh karena itu, pengukuran respon sensor terhadap analit selanjutnya dilakukan pada waktu respon tersebut.

Linieritas

Penentuan linieritas kafein dilakukan dengan memplot kadar kafein (100-500 ppm) versus intensitas masing-masing warna merah, hijau, biru dan merah-hijau-biru sensor pada menit ke-10, 12, dan 14. Pada menit ke-12, intensitas warna sensor di semua kanal warna (merah, hijau, biru dan merah-hijau-biru) tertinggi jika dibandingkan dengan intensitas warna pada menit ke-10 dan ke-14. Selanjutnya, profil linieritas kafein di berbagai kanal warna pada menit ke-12 dapat dilihat pada Gambar 4B-4E.





Gambar 4. Profil warna sensor setelah penambahan kafein (100-500 ppm) (A) dan kurva linieritasnya pada kanal warna merah (B), hijau (C), biru (D) dan merah-hijau-biru (E).

Pada Gambar 4C terlihat bahwa profil kurva baku pada pengukuran intensitas warna biru sensor memberikan nilai koefisien korelasi tertinggi ($r = 0,9984$). Oleh karena itu, pengukuran respon sensor terhadap analit selanjutnya menggunakan intensitas warna biru ($\Delta mean B$).

Batas deteksi dan batas kuantitasi

Penentuan batas deteksi (LOD) dan kuantitasi (LOQ) dilakukan dengan menentukan konsentrasi terkecil dari analit yang masih dapat dideteksi dan dikuantitasi atau yang masih dapat memberikan perubahan warna yang signifikan terhadap blangko^[22] dengan

menggunakan kurva baku kafein (100-500 ppm) pada menit ke-12. Hasil perhitungan menunjukkan batas deteksi sensor kafein = 90 ppm, sedangkan batas kuantitasi kafein = 95 ppm.

Reprodusibilitas

Penentuan reprodusibilitas sensor dilakukan dengan mengukur intensitas warna biru sensor setelah penambahan larutan sampel kopi (kafein 300 ppm) sebanyak enam kali pada menit ke-12. Hasil pengukuran intensitas warna sensor dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengukuran kadar kafein sampel kopi menggunakan sensor pada menit ke-12

Sampel	Intensitas biru (Δ mean Blue)	Konsentrasi (mg/L)
1	28,611	310,253
2	29,172	301,823
3	29,369	298,924
4	28,762	310,545
5	28,946	311,545
6	29,139	302,778
	Rata-rata	305,978
	SD	5,429
	RSD (%)	1,774

Tabel 2. Perolehan kembali kadar kafein pada adisi kafein 30, 45, dan 60 % dari kadar kafein awal 300 ppm ($n = 3$)

Adisi (%)	Konsentrasi kafein teoritis (ppm)	Perolehan kembali kafein (ppm)	Perolehan kembali kafein (%)
30	349,863	346,330 \pm 1,625	98,990 \pm 0,464
45	390,231	393,260 \pm 5,969	100,776 \pm 1,530
60	430,600	437,538 \pm 0,881	101,517 \pm 0,204
			100,428 \pm 0,702

Tabel 3. Hasil penetapan kadar kafein pada berbagai sampel biji kopi menggunakan sensor kimia dan Spektrofotometer UV-Vis ($n = 3$)

Sampel kopi	Sensor kimia (mg)	Spektrofotometer UV-Vis (mg)	p
Arabika A	19,625 \pm 0,525	19,688 \pm 0,041	0,961
Robusta A	28,949 \pm 1,136	28,505 \pm 0,039	0,754
Robusta B	24,004 \pm 0,497	24,905 \pm 0,043	0,521
Robusta C	22,088 \pm 0,868	22,872 \pm 0,090	0,784
Robusta D	35,729 \pm 1,527	35,322 \pm 0,051	0,825

Pada tabel terlihat bahwa koefisien variasi (*RSD*) pengukuran kurang dari 2 %, sehingga metode analisis yang dikembangkan memiliki keterulangan analisis yang baik^[22].

Akurasi

Penentuan akurasi dilakukan dengan mengukur intensitas warna biru larutan sampel kopi (kafein 269,125 ppm) yang ditambah dengan 30%, 45%, dan 60% dari kadar awal^[23]. Persen perolehan kembali (*recovery*) kafein seperti yang terlihat pada Tabel 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode analisis

yang dikembangkan memiliki akurasi yang baik^[23].

Aplikasi sensor kimia

Hasil penetapan kadar kafein sampel biji kopi menggunakan metode sensor kimia-skanometri dan spektrofotometri dapat dilihat pada Tabel 3. Nilai signifikansi (p) semua sampel lebih besar daripada nilai α (0.05), sehingga hasil penetapan kadar kafein kedua metode tidak berbeda secara bermakna. Oleh karenanya, metode sensor kimia-skanometri dapat digunakan sebagai metode alternatif penetapan kadar kafein sampel kopi.

Kesimpulan

Sensor kimia untuk penetapan kadar kafein telah dikembangkan dengan mengimobilisasi larutan NaIO₄, CH₃COOH dan MBTH pada kertas saring. Sensor kafein tersebut memiliki rentang linieritas 100-500 ppm dengan batas deteksi 90 ppm. Keterulangan hasil analisis kafein menggunakan sensor baik (RSD < 2%) dan akurat (perolehan kembali kafein 100%). Hasil analisis kafein pada sampel biji kopi menggunakan sensor tidak berbeda bermakna dengan metode spektrotometri, sehingga metode yang dikembangkan dapat digunakan sebagai metode alternatif penetapan kadar kafein dalam sampel kopi.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Universitas Jember atas dana hibah penelitian yang telah diberikan melalui program Hibah KeRis (Kelompok Riset) Tahun 2021.

Daftar Pustaka

- Mejia, E. G. de. & Ramirez-Mares, M. V., Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends Endocrinol. Metab.*, **25(10)**: 489–492 (2014).
- Freedman, N. D., Park, Y., Abnet, C. C., Hollenbeck, A. R. & Sinha, R., Association of Coffee Drinking with Total and Cause-Specific Mortality. *N. Engl. J. Med.*, **366(20)**: 1891–1904 (2012).
- Vignoli, J. A., Bassoli, D. G. & Benassi, M. T., Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chem.*, **124(3)**: 863–868 (2011).
- Badan POM., *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 21 Tahun 2016*. (2016).
- BSN., *Kopi bubuk*. (2004).
- BSN., *Kopi Gula Krimer Dalam Kemasan*. (2011).
- BSN., *Kopi instan*. (2014).
- Adnan, A., Naumann, M., Mörlein, D. & Pawelzik, E., Reliable Discrimination of Green Coffee Beans Species: A Comparison of UV-Vis-Based Determination of Caffeine and Chlorogenic Acid with Non-Targeted Near-Infrared Spectroscopy. *Foods*, **9(6)**: 788 (2020).
- Legas Muhammed, B., Hussien Seid, M. & Habte, A. T., Determination of Caffeine and Hydrogen Peroxide Antioxidant Activity of Raw and Roasted Coffee Beans Around Habru Woreda, Ethiopia Using UV-Vis Spectroscopy. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.*, **Volume 13**: 101–113 (2021).
- Navarra, G., Moschetti, M., Guarrasi, V., Mangione, M. R., Militello, V. & Leone, M., Simultaneous Determination of Caffeine and Chlorogenic Acids in Green Coffee by UV/Vis Spectroscopy. *J. Chem.*, **2017**: 1–8 (2017).
- Jeon, J.-S., Kim, H.-T., Jeong, I.-H., Hong, S.-R., Oh, M.-S., Park, K.-H., Shim, J.-H., *et al.*, Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions. *J. Chromatogr. B*, **1064**: 115–123 (2017).
- Awwad, S., Issa, R., Alnsour, L., Albals, D. & Al-Momani, I., Quantification of Caffeine and Chlorogenic Acid in Green and Roasted Coffee Samples Using HPLC-DAD and Evaluation of the Effect of Degree of Roasting on Their Levels. *Molecules*, **26(24)**: 7502 (2021).
- Fajara, B. E. P. & Susanti, H., HPLC determination of caffeine in coffee beverage. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, **259**: 012011 (2017).
- Rochat, S., Steinmann, S. N., Corminboeuf, C. & Severin, K., Fluorescence sensing of caffeine in water with polysulfonated pyrenes. *Chem. Commun.*, **47(38)**: 10584 (2011).
- Luchiari, N. da C., da Silva, G. A., Marasco Júnior, C. A. & Lima Gomes, P. C. F. de., Development of miniaturized fluorimetric device for caffeine determination using a smartphone. *RSC Adv.*, **9(60)**: 35033–35038 (2019).
- Singh, D. K. & Sahu, A., Spectrophotometric determination of caffeine and theophylline in pure alkaloids and its application in pharmaceutical formulations. *Anal. Biochem.*, **349(2)**: 176–180 (2006).
- Shpigun, L. K., Andryukhina, E. Y. & Shushenachev, Y. V., Spectrophotometric determination of purine alkaloids by flow injection and sequential injection analysis. *J. Anal. Chem.*, **70(8)**: 926–935 (2015).
- Hidayat, M. A., Sari, P. & Kuswandi, B., Simple scanometric assay based on DPPH immobilized on pharmaceutical blister for determination of antioxidant capacity in the

- herbal extracts. *J. Res. Pharm.*, **22(1)**: 134–143 (2018).
19. Hidayat, M. A., Chassana, R. I., Ningsih, I. Y., Yuwono, M. & Kuswandi, B., The CUPRAC-paper microzone plates as a simple and rapid method for total antioxidant capacity determination of plant extract. *Eur. Food Res. Technol.*, **245(9)**: 2063–2070 (2019).
20. Hidayat, M. A., Maharani, D. A., Purwanto, D. A., Kuswandi, B. & Yuwono, M., Simple and Sensitive Paper-based Colorimetric Biosensor for Determining Total Polyphenol Content of the Green Tea Beverages. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **25(2)**: 255–263 (2020).
21. Kuswandi, B., Fantoni, M., Hidayat, M. A. & Ningsih, I. Y., Paper microzone plate based on DPPH as a simple colorimetric assay of the total antioxidant content of herbal extracts. *J. Food Sci. Technol.*, **57(5)**: 1971–1976 (2020).
22. Indrayanto, G., Validation of Chromatographic Methods of Analysis: Application for Drugs That Derived From Herbs. in *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, **43**: 359–392 (2018).
23. Huber, L., *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Informa Healthcare USA, (2007).