

## Penyiapan Material Acuan Untuk Penentuan *Trigonelline* Dalam Biji Kopi Hijau Menggunakan HPTLC

### *Preparation of Reference Material for Trigonelline Determination Inside of Green Coffee Beans Using HPTLC*

Yeni M. Muflihah<sup>1\*</sup>) dan Buchari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember

<sup>2</sup>Jurusan Kimia, FMIPA, ITB

<sup>\*</sup>Email: yeni.maulidah@gmail.com

#### ABSTRACT

Preliminary study of preparation reference material for trigonelline determination in green coffee beans have been performed by HPTLC method. Physical characterization performed on green coffee beans include the determination of moisture content, ash content and metal content. Water content values obtained on average 6.4% (%RSD 4.8) and ash content 3.9% (%RSD 16.2). Metal determination (Cu, Zn, Fe) with atomic absorption spectrometry method found Cu 9.4 (mg/kg), Zn 12,0 (mg/kg) and Fe 64.0 (mg/kg). Sonication as extraction method using methanol solvent for 30 minutes and separation method HPTLC on aluminum plates coated with silica gel 60 F254. Eluent used was mixture of n-propanol: methanol: water (4:1:4, v/v/v) with elution length 8 cm. Linear regression obtained in concentration range 200-1200 ng spot<sup>-1</sup> with  $R^2 = 0.9857$ . Detection limits obtained 140.7 ng and 468.9 ng for quantitation limit. Repeatability was achieved from 800 ng spot<sup>-1</sup> (% RSD 13.8).

**Keywords** : Reference material, Trigonelline, green coffee, HPTLC

#### PENDAHULUAN

Komposisi senyawa antioksidan dalam kopi akan bervariasi tergantung pada spesies, varietas, derajat pemanggangan, penyimpanan, geografis, dan tingkat kematangan buah kopi (Casal *et al*, 2000; Minamisawa *et al*, 2004). Proses roasting atau pemanggangan merupakan salah satu tahapan pengolahan kopi dimana terjadi proses-proses kimia secara simultan seperti reaksi Mailard dan Stecker, degradasi protein, polisakarida, trigonelline dan asam klorogenat (Bicho *et al*, 2011; Gomez-ruiz *et al*, 2008; Musatto *et al*, 2000). Penelitian-penelitian tersebut menyimpulkan bahwa sebagian senyawa akan mengalami penurunan karena terdegradasi dengan adanya peningkatan suhu dan waktu pemanggangan. Salah satu senyawa yang mengalami perubahan dengan adanya pemanggangan adalah trigonelline.

Trigonelline merupakan hormon tanaman yang memiliki sifat antara lain anti kanker, anti migrain, antiseptik, hipokolesteromik, hipoglikemik dan antipiretik (Martin *et al*, 1997).

Penelitian mengenai trigonelline telah banyak dilakukan, karena selain terdapat dalam kopi, trigonelline juga merupakan komponen aktif dari fenugreek, Tuang-kua-jen dan ubur-ubur (Martin *et al*, 1997). Namun demikian, publikasi mengenai analisis trigonelline dalam kopi masih belum banyak ditemukan karena selain kopi merupakan material kompleks yang terdiri dari ratusan senyawa, kadar trigonelline dalam kopi sendiri tidak terlalu besar, yaitu antara 0,3-1,3% (Bicho *et al*, 2011). Permasalahan-permasalahan tersebut dewasa ini mulai diatasi dengan menggunakan penggunaan material acuan.

Material acuan (*Reference material*) adalah bahan atau zat yang satu atau lebih sifatnya telah di analisa dan cukup homogen serta cukup stabil untuk digunakan sebagai kalibrasi peralatan, penilaian suatu metode pengukuran dan menempatkan nilai suatu material (IAEA, 2003). Material acuan bisa dalam bentuk murni atau merupakan campuran gas, cairan atau padatan. Material acuan banyak dipakai dalam kimia analitik sebagai kalibrasi alat, validasi metode, penilaian performance dari alat, metode dan instrumen dan menentukan ketidakpastian suatu hasil pengukuran.

Material acuan matriks adalah material acuan yang lebih spesifik, suatu senyawa alam yang lebih mewakili sampel-sampel laboratorium yang telah dikarakterisasi secara kimia satu atau lebih elemen, unsur, dengan suatu ketidakpastian yang diketahui.

Metode penelitian untuk penentuan trigonelline yang sudah dipublikasikan, diantaranya adalah penggunaan metode HPLC, UV, HPTLC, TLC, juga penggunaan kromatografi ion kolom tunggal (Martin *et al*, 1997).

HPTLC merupakan salah satu metode pemisahan analitik yang sangat berpotensi berdasarkan kemampuan *reliability*, *reproducibility*, *simplicity* dan kecepatannya. Metode ini sangat ekonomis karena hanya membutuhkan bahan dan pelarut dalam jumlah minim. Waktu analisis yang cukup cepat juga menjadi salah satu kelebihan dari metode HPTLC ini. HPTLC juga tidak dibatasi dengan pemilihan fasa gerak, penggunaan pH tertentu seperti HPLC dan tidak membutuhkan perlakuan tambahan pada sampel. Selain itu dalam HPTLC memungkinkan analisis secara simultan dengan waktu singkat. Metode ini sangat sesuai untuk pemisahan komponen-komponen dari ekstrak tumbuhan yang biasanya terdiri dari banyak senyawa (Srivastava, 2011).

## METODE

### Bahan Penelitian

Kopi yang digunakan adalah kopi Arabika jenis Ateng yang diperoleh dari Desa Pengharapan, Kecamatan Pangalengan, Kabupaten Bandung pada bulan Oktober 2011. Kopi yang digunakan adalah kopi yang matang super. Kopi difermentasi kering, dikeringkan selama 2 minggu pada panas matahari dan di haluskan menggunakan blender.

### Bahan Kimia

Trigonelline (Flucka, Switzerland), metanol (merck), akuades, n-propanol, pelat silika gel 60 F<sub>254</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, HCL 37%.

### Alat-Alat Penelitian

Alat-alat gelas yang biasa digunakan dalam laboratorium, blender, Camag densitometric scanner 2, Camag chamber, spektrofotometer serapan atom (AAS) Shimadzu, Spektrofotometer UV-Vis, furnace, oven, neraca analitik, pipet mikro merk eppendof, Ultrasonic Bath Branson 3510.

### Karakterisasi Fisik

*Penentuan kadar air* dilakukan dengan memanaskan  $\pm 1,00$  gram sampel kopi bubuk di dalam oven selama 2 jam dengan suhu  $\pm 105^{\circ}\text{C}$ , dan dilakukan dengan 20 kali pengulangan.

#### *Penentuan kadar abu*

Kurang lebih 1,00 gram sampel dipanaskan dalam furnace  $750^{\circ}\text{C}$  selama 4 jam, dilakukan 20 kali pengulangan.

#### *Penentuan kadar logam*

Abu hasil pengujian kadar abu didestruksi dengan 10 mL HCL, disaring dan ditandabatkan dengan akuades sampai 100 mL. Analisa dilakukan dengan spektrofotometer serapan atom menggunakan kurva kalibrasi logam Cu, Zn dan Fe masing masing 0,2;0,4;0,6;0,8 dan 1,0 ppm.

### Isolasi Trigonelline Dari Sebuk Kopi Hijau

Sejumlah 500 mg sampel kopi hijau dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL dan ditambahkan 25 mL metanol. Larutan disonikasi pada 50-60Hz selama 30 menit. Selanjutnya disaring dan ditandabatkan sampai 50 mL dengan metanol. Perlakuan diulang sebanyak 10 kali.

### Instrumentasi Kromatografi.

Pemisahan dengan KLT kinerja tinggi dilakukan menggunakan *chamber* Camag berukuran 21 cm x 10 cm x 20 cm. Plat yang digunakan adalah plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> dengan ukuran 20 cm x 10 cm. Panjang jarak elusi dari titik awal penotolan ke garis akhir adalah 8 cm, dengan jarak antar spot adalah 1 cm. Larutan pengelusi yang digunakan adalah larutan campuran n-propanol:metanol:air (40:10:40, v/v/v). Setiap analisis menggunakan 30 mL larutan pengelusi dengan lama penjuanan 30 menit. Volume sampel yang ditotolkan untuk setiap spot adalah sebanyak 20  $\mu\text{L}$ , yang dilakukan dengan menggunakan pipet eppendof 1-10 mikro. Setiap penotolan sebanyak 1  $\mu\text{L}$  dan langsung dikeringkan menggunakan pengering rambut (*hair dryer*).

### Pembuatan Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat dengan menyiapkan sederetan larutan standart trigonelline 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm dan 70 ppm. Larutan selanjutnya di totolkan ke plat KLT sejumlah 20  $\mu\text{L}$  untuk mendapatkan konsentrasi 200, 400, 600, 800, 1000 dan 1200 ng setiap spot.

**Validasi Metode**

*Keberulangan*

Pengukuran keberulangan dilakukan dengan menggunakan larutan standar trigonelline 40 ppm untuk mendapatkan 800 ng per noda. Penotolan dilakukan sebanyak 6 titik dan diekspresikan dengan %RSD (persen relatif standar deviasi).

**Limit Deteksi Dan Limit Kuantisasi**

Limit deteksi dicari dengan menggunakan nilai eror pada kurva kalibrasi yang didapatkan menggunakan program origin pro 8. Limit deteksi adalah 3 kali eror relatif, sedangkan limit kuantisasi adalah 10 kali eror relatif.

**Perolehan Kembali (Recovery)**

Sampel yang belum dianalisis ditambahkan trigonelline standar 1000 ppm sebanyak 0, 1, 2 dan 3 mL dan sampel dianalisis kembali menggunakan metode yang diusulkan. Metode ini dilakukan untuk mengetahui perolehan kembali trigonelline pada level yang berbeda.

**Pemisahan Trigonelline Dari Ekstrak.**

Ekstrak yang dihasilkan masing-masing ditotolkan ke atas plat dengan jumlah penotolan sebanyak 20 µL dan di elusi dengan cara yang sama seperti standart.

**HASIL dan PEMBAHASAN**

**Karakterisasi Serbuk Kopi**

Dari tabel 1 didapatkan bahwa kadar air sebesar 6,4 dengan %RSD 4,2. Kadar air akan menunjukkan kualitas suatu sampel kopi. Kadar air yang terlalu tinggi akan menurunkan kopi dan memperpendek waktu penyimpanan. Hasil pengujian one way ANOVA (program SPSS 15,0) menunjukkan bahwa sampel kopi yang dianalisis homogen, dengan ada perbedaan antar pengulangan pada taraf signifikansi 0,05.

Kadar abu merupakan sisa-sisa pembakaran atau oksidasi, dan erat kaitannya dengan mineral dalam suatu bahan, dan dibandingkan dengan berat keringnya. Kadar abu menunjukkan jumlah mineral yang terkandung dalam suatu sampel. Dari pengukuran kadar abu didapatkan nilai rata-rata kadar abu 3,9% dengan %RSD 16,2. Hasil pengujian dengan one way ANOVA menunjukkan sampel yang digunakan homogen dan tidak ada perbedaan antar pengulangan.

Tabel 1 kadar air dan kadar abu

Sampel	Rata-rata (%)	Standart deviasi	% R.S.D
Kadar air	6,4	0,7	4,2
Kadar abu	3,9	0,6	16,2

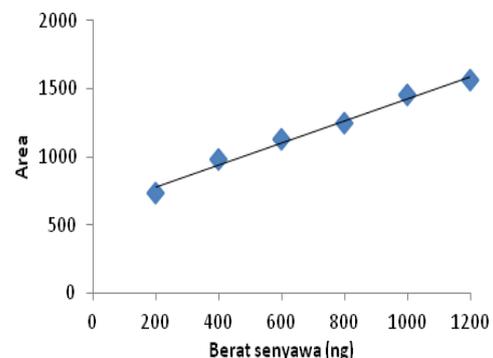
Kadar logam Cu, Zn dan Fe masing-masing adalah 9,4 (mg/Kg), 12,0( mg/Kg) dan 64,0 (mg/Kg).

Tabel 2 Kadar logam (mg/kg)

Bahan	Rerata	S.D.	%R.S.D
Cu	9,4	3,2	34,5
Zn	12,0	1,7	13,9
Fe	64,0	7,6	11,8

**Kurva Kalibrasi**

Pengembangan metode KLT-KT untuk penentuan trigonelline menunjukkan korelasi yang baik pada range konsentrasi 200-1200 ng per spot dengan koefisien korelasi sebesar 0,9857 yang diperoleh dari luas areanya. Nilai slope (Gambar 1) diperoleh sebesar 0,8099 ( $\pm 0,04876$ ) dan intersepnya sebesar 619,686 ( $\pm 37,9799$ )



Gambar 1. Korelasi konsentrasi terhadap dengan koefisien korelasi

**Validasi Metode**

Nilai Rf untuk trigonelline standar dan trigonelline dalam sampel didapatkan pada harga Rf sebesar  $0,45 \pm 0,02$ . Pengulangan analisis untuk konsentrasi 800 ng per noda menunjukkan %RSD sebesar 13,82 seperti terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengukuran keberulangan standar trigonelline 800 ng per nota

No	Sampel	Rata-rata	Standart Deviasi	%RSD	Kepercayaan (0,05)
1	Repeatability	849,23	117,35	13,82	93,9

Tabel 4. Pengukuran perolehan kembali trigonelline (recovery)

No	Jumlah analit ditambahkan (%)	Jumlah analit ditambahkan (ng)	Nilai teori (ng)	Jumlah yg ditemukan (ng)	Recovery (%)
1	0	0	570,7	570,7	100
2	50	400	970,7	960	97,3
3	100	800	1370,7	1091,6	65,1
4	200	1200	1770,7	1496,6	77,2

Recovery test (Tabel 4) menunjukkan bahwa untuk penambahan trigonelline semakin tinggi semakin sedikit prosentasi perolehan kembali trigonelline. Dari data yang dihasilkan terlihat bahwa persen *recovery* untuk sampel dengan penambahan trigonelline 100% dan 200% hasilnya kurang dari 90%. Hal ini kemungkinan diakibatkan trigonelin dari dalam kopi sendiri masih belum terekstrak sempurna, atau membutuhkan waktu yang lebih lama untuk terekstrak.

#### Estimasi Kadar Trigonelline Dalam Ekstrak Kopi Hijau

Pengukuran ekstrak kopi menggunakan HPTLC memperoleh kromatogram dengan puncak utama  $R_f = 0,45 \pm 0,02$  pada pengukuran panjang gelombang 265 nm. Pada kromatogram sampel hasil isolasi, selain puncak utama, juga muncul 4 puncak lainnya yaitu pada  $R_f = 0,76$ ;  $R_f = 0,88$ ,  $R_f = 0,92$  dan  $R_f = 0,97$ . Puncak-puncak ini belum teridentifikasi senyawanya karena belum ada literatur yang membahas senyawa tersebut. Namun 3 puncak di terakhir puncaknya hampir bertumpuk yang mengindikasikan pemisahan yang terjadi belum sempurna dan membutuhkan waktu yang lebih lama atau pelarut yang lebih sesuai untuk terpisah sempurna.

#### KESIMPULAN

Biji kopi yang dipersiapkan menggunakan prosedur yang disiapkan di atas berpotensi untuk dapat digunakan sebagai material acuan dalam penentuan trigonelline biji kopi hijau dengan menggunakan kadar air, kadar abu dan kadar logam sebagai salah satu parameter analisisnya.

Metode HTCLP secara statistik memenuhi beberapa persyaratan untuk digunakan sebagai metode analisis, antara lain *reproducibility*, *recovery*, limit deteksi dan limit kuantisasi.

#### Ucapan TerimaKasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dirjen Dikti melalui pemberian dana BPPS sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan lancar.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bicho, N.C., Leitao, A.E., Ramalho, J.C., Lidon, F.C., 2011, Identification of Chemical Clusters Discriminators of Roast Degree in Arabica and Robusta Coffee Beans, *J. Eur. Food Res Technol* (233) 303-311
- Casal, S., Oliveira, M.B.P.P., Alves, M.R., Ferreira, M.A., 2000, Discriminate Analysis of Roasted Coffee Varieties for Trigonelline, Nicotinic Acid and Caffein Content, *J.Agric.Food chem* (48):3420-3424
- Gomez-ruiz, J.A., Ames, J.M., Leake, D.S., 2008, Antioxidant Activity and Protective Effects of Green and Dark Coffee Components Against Human Low Density Lipoprotein Oxidation, *Eur Food Res Technol* (227) 1017-1024
- International Atomic Energy Agency (IAEA), 2003, Development and Use of Reference Materials and Quality Control Material, IAEA, Austria
- Minamisawa, M., Yoshida, S., Takai, N., 2004, Determination of Biologically Active Substances in Roasted Coffee Using a Diode-HPLC system, *Anal. Sci.*, 20: 325-328.
- Musatto, S.I., Machado, E.M.S., Martins, S., teixeira, J.A., 2011, Production, Composition, and Application of Coffee and its Industrial Residues: Review Paper, *Food Bioprocess technology*, (4): 661-672

- Martin, M.J., pables, F., Belle, M.A., Gonzales, A.G., 1997, Determination of trigonelline in green and roasted coffee from single column ionic chromatography, *Fresenius J Anal Chem* (357) 357-358
- Srivastava, M.M., 2011, High performance thin-layer chromatography (HPTLC), springer-verlag Berlin Heidelberg