

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Minuman Cokelat**

Minuman cokelat adalah salah satu produk pangan olahan kakao. Produk ini dibuat dari bubuk cokelat yang dipadukan dengan bahan lain seperti gula, susu, perasa, dan lain-lain. Minuman cokelat merupakan suatu suspensi dimana terdapat padatan bubuk cokelat sebagai “fase terdispersi” dan air sebagai “fase pendispersi” (Wijanarti *et al.*, 2020).

##### **1. Manfaat minuman cokelat**

Minuman cokelat memiliki manfaat yang baik untuk tubuh diantaranya, baik untuk kesehatan jantung, dapat mengurangi resiko stroke, menurunkan resiko diabetes, meningkatkan aliran darah serta menurunkan tekanan darah. Minuman cokelat juga dapat meningkatkan aliran darah ke otak, meningkatkan suasana hati, menurunkan kadar kolesterol, anti depresan serta melindungi dari neurodegenerasi (seperti Alzheimer dan Parkinson) (Saras, 2023).

##### **2. Kandungan minuman cokelat**

Minuman cokelat mengandung flavonoid, terutama jenis flavan-3ol seperti epikatekin, katekin dan procianidin, teobromin, kafein, polifenol, asam fenolat, flavonoid, triptofan serta feniletamin (PEA). Minuman coklat juga mengandung magnesium, zat besi, kalium, zink dan tembaga, serta kalsium dan fosfor (Saras, 2023).

##### **3. Efek negatif konsumsi minuman cokelat**

Mengonsumsi minuman cokelat yang berlebih dapat mengakibatkan menyebabkan plak dan kerusakan gigi, gangguan tidur, obesitas, jantung berdebar atau kecemasan, diare, intoleransi laktosa, diare, migrain atau sakit kepala, dan gangguan ginjal (Nisak & Mahmudiono, 2017).

##### **4. Analisis minuman cokelat**

Uji kualitatif pada minuman cokelat dapat dilakukan dengan metode reaksi warna Parry, uji murexide, KCKT, Spektrofotometri UV-Vis, Spektrofotometri IR. Reaksi warna parry bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa flavan-3ol dan

proantosianidin. Uji murexide digunakan untuk mendeteksi keberadaan theobromin dan kafein. Metode KCKT berdasarkan kromatogram yang muncul pada luas area tertentu. Metode spektrofotometri UV-Vis dan spektrofotometri IR bertujuan untuk menganalisis gugus fungsi dan serapan senyawa tertentu berdasarkan panjang gelombang cahaya yang diserap (Roosinda *et al*, 2021).

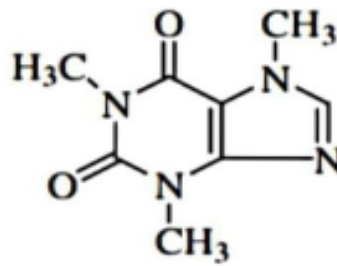
Uji kuantitatif minuman coklat dapat dilakukan dengan metode KCKT, Spektrofotometri UV-Vis, dan Titrasi bebas air. Metode KCKT dapat digunakan karena mampu mengukur senyawa target dengan akurasi tinggi. Metode spektrofotometri digunakan untuk menentukan konsentrasi senyawa berdasarkan hukum Lambert-Beer (Susanti *et al.*, 2020). Titrasi bebas air mampu mengukur kadar alkaloid menggunakan pelarut non air dan indikator yang sesuai (Anasari *et al.*, 2024)

## **B. Kafein**

Kafein adalah salah satu senyawa golongan alkaloid yang paling banyak ditemukan dalam biji kopi, daun teh dan biji coklat (Abriyani *et al*, 2023). Kafein yang ditemukan dalam sumber makanan utama bervariasi secara signifikan: 93,0 – 163,5 mg per cangkir dalam kopi bubuk, 46,7 - 67,6 mg per cangkir dalam kopi instan, 30,2 - 67,4 mg per cangkir dalam teh kantung dan 0,32 - 0,54 mg / g dalam gelap coklat manis (Prasasty, 2019).

### **1. Struktur kafein**

Kafein memiliki rumus kimia  $C_8H_{10}N_4O_2$  dan nama IUPAC 1,3,5-trimetilxantin. Gugus metilnya berikatan dengan ketiga hydrogen dan nitrogen pada cincin xantin. Kafein memiliki struktur kimia dengan 3 senyawa alkaloid yaitu xantin, teofilin dan teobromin. Kafein dalam keadaan murni berbentuk kristal prisma hexagonal yang berupa serbuk berwarna putih, tidak berbau dan memiliki rasa sedikit pahit (Kemenkes, 2014)



**Gambar 1. Struktur Kafein (Kemenkes, 2014)**

## **2. Sifat fisika kafein**

Kafein berbentuk serbuk atau hablur bentuk jarum mengkilat biasanya menggumpal, berwarna putih, tidak berbau, berasa pahit, larutan bersifat netral terhadap kertas lakmus, bentuk hidratnya mengembang di udara. Kafein mudah larut dalam kloroform, agak sukar larut dalam air dan dalam etanol, sukar larut dalam eter. Simpan dalam wadah tertutup baik (Kemenkes, 2014).

## **3. Mekanisme kerja kafein**

Kafein mempunyai efek di dalam tubuh sekitar 5 jam setelah dikonsumsi. Efek tersebut dapat bervariasi antara 1,5-9,5 jam tergantung pada individu, karakteristik psikologi dan lingkungan (obesitas, merokok, ketinggian, kehamilan). Kafein dimetabolisme menjadi lebih dari 25 metabolit, terutama paraxanthine, theobromine, dan teofilin. Pada tubuh manusia kafein yang dikonsumsi hanya 3% yang diekskresi dan 97% sisanya di metabolisme. Rute utama metabolisme kafein adalah di dalam hati. Sisa kafein yang tidak terdegradasi akan dieliminasi melalui sistem renal. Produk akhir metabolisme kafein menghasilkan paraxanthine sebagai produk utama (Fernandi, 2019).

## **4. Fungsi klinis kafein**

Kafein memiliki efek farmakologis yang bermanfaat secara klinis, seperti menstimulasi susunan saraf pusat, relaksasi otot polos terutama otot polos bronkus dan stimulasi otot jantung. Kafein juga dapat merangsang pelepasan dopamin, neurotransmitter (zat kimia pada otak) (Aurhelia & Sari, 2023)

Kafein memiliki kemampuan dalam membantu mencegah kantuk, menjaga kewaspadaan, menurunkan berat badan, risiko Diabetes Melitus (DM) tipe II, risiko

Parkinson dan kanker (Fernandi, 2019). Kafein juga bisa menambah rasa senang, bersemangat dan berenergi (Aurhelia & Sari, 2023).

### **5. Efek samping kafein**

Kafein yang berlebih akan menyebabkan nyeri kepala, mual, dan gelisah (Fernandi, 2019). Selain itu, kafein dapat menimbulkan gangguan tidur, sulit berkonsentrasi, mudah lelah dan lesu. Kafein pada orang dewasa dapat menimbulkan spektrum gejala klinis, mulai dari rasa gugup, mudah tersinggung, insomnia, gangguan sensorik, diuresis, aritmia, takikardia, peningkatan pernapasan dan gangguan gastrointestinal. Paparan kronis kafein dapat menyebabkan disfungsi sistem pencernaan, hati, sistem ginjal dan otot (Aurhelia & Sari, 2023).

### **6. Metode pengujian kafein**

Kafein dapat dianalisis secara kualitatif menggunakan reaksi murexide (reaksi yang terjadi antara kafein yang merupakan senyawa turunan purin dengan asam nitrat, menghasilkan senyawa turunan purin yang berbeda kemudian bereaksi dengan amonia dan kalsium yang akan membentuk kompleks warna), reaksi parry (reaksi antara ion kobalt yang bermuatan dua positif di dalam reagen parry akan mengikat gugus nitrogen yang ada di dalam senyawa kafein), KLT, FTIR, KCKT dan Spektrofotometri UV-Vis. Kafein juga dapat dianalisis secara kuantitatif menggunakan KCKT, Spektrofotometri UV-Vis dan titrasi bebas air (Perbina *et al.*, 2020).

### **7. Batas konsumsi kafein**

Menurut FDA (*Food Drug Administration*), dosis kafein yang dikonsumsi tidak boleh melebihi 100 mg – 200 mg per hari, sedangkan menurut SNI 01-7152-2006 batas maksimum kafein dalam makanan dan minuman adalah 150 mg/hari atau 50 mg/sajian (Rahmawati *et al.*, 2021).

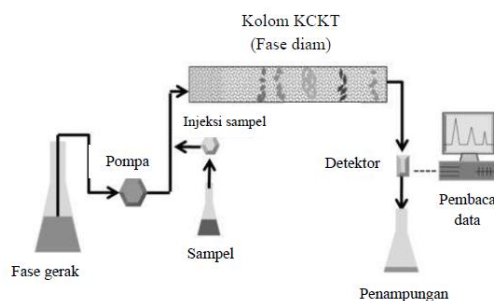
## **C. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah suatu teknik pemisahan yang menggunakan fase gerak yang berupa cairan. Keberhasilan suatu analisis juga sangat dipengaruhi oleh ketepatan kromatografer dalam memilih dan menggunakan

kolom dan komposisi fase gerak untuk mendapatkan nilai selektivitas yang besar sehingga interaksi antara analit, fase diam dan fase gerak dapat maksimal (Prasasty, 2019).

### 1. Skema kerja KCKT

Persiapan sampel yang akan dianalisis dengan KCKT, sampel cair atau sampel padat dilarutkan dengan menggunakan pelarut yang sesuai kemudian dialirkan pada kolom kromatografi dengan fase gerak cair. Kromatografi cair-cair didasarkan pada konsep koefisien partisi, yaitu setiap analit terpartisi diantara dua pelarut '*immiscible*' (yang tidak saling melarutkan). Satu pelarut dibuat '*immobile*' (cairan yang disokong dengan padatan) dan yang satunya dibuat '*mobile*' (Prasasty, 2019).



Gambar 2. Skema Alat KCKT (Prasasty, 2019)

### 2. Kelebihan dan kekurangan KCKT

Kelebihan penggunaan metode KCKT untuk analisis antara lain: waktu analisis yang singkat, penentuan analit dapat dilakukan pada jumlah mikro, hasil pemisahan tinggi dan kondisi yang cukup. Sedangkan kekurangannya, KCKT memiliki keterbatasan yaitu jika analit yang akan dianalisis sangat kompleks maka resolusi yang baik sulit diperoleh (Prasasty, 2019).

### 3. Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Pada dasarnya, Instrumen KCKT terdiri dari beberapa komponen, antara lain:

**3.1. Reservoir Fase Gerak.** *Reservoir* dilengkapi dengan suatu alat *degasser* yang dapat menghilangkan gas terlarut pada fase gerak (biasanya oksigen dan nitrogen) yang mengganggu analisis karena dapat membentuk gelembung pada kolom dan sistem detektor. *Degasser* terdiri dari suatu pompa vakum, sistem

destilasi, alat pemanas dan suatu sistem pengaduk pelarut. *Reservoir* juga dilengkapi dengan penyaring milipore yang mampu menyaring partikel-partikel halus pada pelarut. Hal ini penting karena partikel halus dapat menimbulkan kerusakan (menyumbat) sistem *injector*, pompa dan juga kolom (Susiyanti dan Dachriyanus, 2022)

**3.2. Pompa.** Berbagai pompa tersedia untuk kromatografi cair. Semuanya dirancang untuk mendorong berbagai pelarut melalui kolom yang dikemas rapat. Karena tekanan kolom terhadap aliran tinggi maka pompa harus bekerja pada tekanan tinggi, sering kali lebih besar dari 1000 psi. Ada beberapa persyaratan sistem pompa KCKT antara lain: Memberikan tekanan yang tinggi, memberikan kecepatan aliran 0,1 – 10 ml/menit, aliran terkontrol dengan reproduisibilitas kurang dari 0,5%, tahan karat oleh karena itu seal pompa terbuat dari bahan baja atau teflon, dapat memberikan aliran sistem isokratik maupun gradient (Susiyanti dan Dachriyanus, 2022).

**3.3. Injektor.** Injeksi sampel untuk dianalisis dengan metoda KCKT merupakan tahap yang penting, karena meskipun kolom telah memadai hasil kromatogram yang ditampilkan tidak akan memadai kalau injeksi sampel tidak dilakukan dengan tepat. Kadaan ini akan menjadi suatu keharusan jika yang dituju adalah analisis kuantitatif dengan KCKT (Susiyanti dan Dachriyanus, 2022). Penyuntikan cuplikan dengan memasukkan cuplikan itu ke dalam syringe dan menusukkan jarum syringe melalui septum elastomer merupakan cara penyuntikan pada kolom yang paling sederhana. Injektor septum pada kromatografi cair merupakan injektor paling murah, tetapi memerlukan perhatian yang lebih. Septum berkontak dengan pelarut bertekanan tinggi, karena itu kita harus memilih bahan septum yang tidak termakan oleh pelarut (Susiyanti dan Dachriyanus, 2022).

**3.4. Kolom.** Kolom pada KCKT merupakan bagian yang sangat penting, sebab pemisahan komponen – komponen sampel akan terjadi di dalam kolom. Kolom KCKT dibuat dalam bentuk lurus yang dimaksudkan untuk efisiensi kolom, sehingga didapatkan harga  $H$  minimal. Kolom umumnya dibuat dari stainless steel, dengan bentuk lurus dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar. Kolom dapat dipanaskan agar dihasilkan pemisahan yang lebih efisien, akan tetapi

suhu di atas  $60^{\circ}$  jarang digunakan, karena dapat menyebabkan terjadi penguraian fase diam ataupun penguapan fase gerak pada suhu yang lebih tinggi tersebut. Pengepakan kolom tergantung pada model KCKT yang digunakan (Susiyanti dan Dachriyanus, 2022).

**3.5. Detektor.** Karakteristik yang harus dimiliki oleh suatu detektor adalah detektor harus memiliki repon terhadap larutan yang cepat, sensitifitas yang tinggi, stabil mempunyai volume sel yang kecil sehingga dapat mampu meminimalkan pelebaran pita, sinyal yang dihasilkan harus dapat berbanding lurus dengan konsentrasi larutan, tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak (Prasasty, 2019)

#### **D. Verifikasi Metode Analisis**

Verifikasi metode analisis digunakan untuk memastikan bahwa suatu metode atau prosedur analisis yang digunakan memenuhi semua persyaratan dan membuktikan kemampuan laboratorium dalam melaksanakan pengujian tersebut. Verifikasi metode analisis menghasilkan data yang valid sekaligus menilai kualitas, keandalan, dan konsistensi hasil analisis (Ramadhan & Musfiroh, 2021).

##### **1. Akurasi**

Akurasi menggambarkan tentang kedekatan/kesesuaian antara nilai sebenarnya secara konvensional atau nilai berdasarkan referensi dengan nilai yang diperoleh. Nilai akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan spiking pada suatu sampel. Akurasi dinyatakan dengan *% recovery*. Akurasi dapat ditentukan dengan minimal 9 kali penetapan dengan minimal 3 level konsentrasi pada rentang tertentu, misalnya 3 konsentrasi dengan masing-masing 3 kali replikasi (Prasasty, 2019).

##### **2. Presisi**

Presisi menunjukkan kedekatan (derajat persebaran) antara serangkaian pengukuran yang diperoleh dari *multiple sampling* sampel homogen pada kondisi yang telah ditentukan. Presisi biasanya ditunjukkan sebagai standar deviasi atau koefisien variasi pada serangkaian pengukuran. Penentuan presisi dilakukan dengan menganalisis 1 sampel kemudian dilakukan pengulangan beberapa kali, lalu

ditentukan rata – rata (mean), simpangan baku (SD) dan persen simpangan baku relatif (%RSD). (Prasasty, 2019).

### **3. Linearitas**

Linearitas suatu prosedur analitik merupakan kemampuan suatu prosedur analitik (dengan rentang tertentu) untuk mendapatkan hasil yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi (jumlah) analit dalam sampel. Linearitas dapat dinyatakan dengan koefisien korelasi ( $r$ ) dimana untuk analisis komponen utama, nilai  $r$  harus  $> 0,999$  (Prasasty, 2019).

### **4. Spesifitas**

Spesifisitas adalah kemampuan suatu metode untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks. Spesifisitas merupakan kemampuan suatu metode untuk mengukur secara akurat dan spesifik suatu analit dalam sampel (Prasasty, 2019).

## **E. Keterangan Empiris**

Berdasarkan landasan teori yang ada dapat disusun suatu keterangan empiris dalam penelitian ini yaitu:

Sampel minuman coklat yang dijual di *coffee shop* daerah Delanggu Klaten mengandung kafein. Kafein dapat ditetapkan kadarnya menggunakan KCKT karena struktur kafein yang mempunyai gugus kromofor dapat terbaca oleh detektor UV dari KCKT untuk mengetahui batas konsumsi harian yang sesuai dengan aturan SNI 01-7152-2006.