

LAPORAN PENELITIAN

**KORELASI SUHU SANGRAI DAN AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN EKSTRAK BIJI CARICA DIENG (*Carica
pubescens*)**

ZULHAN ARIF

SISKI ANDINI SUKOWATI

RUDI HERYANTO



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2021**

PENDAHULUAN

Asupan antioksidan dari makanan atau minuman menjadi salah satu yang disarankan dalam menurunkan risiko penyakit infeksi. Asupan antioksidan bagi tubuh dapat diperoleh dari berbagai sumber makanan dan minuman. Olahan kopi sendiri semakin beragam dan mengalami diversifikasi dari bahan selain biji kopi. Pengistilahan produk pangan diversifikasi selalu diikuti nama bahannya, dalam hal ini kopi yang dibuat dari biji carica maka disebut dengan nama kopi biji carica. Penganekaragaman minuman kopi ini berkaitan dengan kebutuhan masyarakat yang menghindari efek kafein pada biji kopi. Biji buah carica khas Dieng (*Carica pubescens*) dilaporkan memiliki potensi antioksidan karena adanya kandungan metabolit sekunder. Masyarakat belum dapat mengolahnya karena struktur yang cukup keras sehingga masih menjadi limbah dalam industri sirup buah carica. Pemanfaatan biji carica menjadi kopi dirasa prospektif dalam mengoptimalkan kandungan metabolit sekundernya sebagai antioksidan (Umami 2018).

Pengolahan produk kopi diversifikasi meliputi beberapa tahap layaknya akan membuat kopi pada umumnya. *Roasting* atau penyangraian termasuk dalam proses perlakuan pascapanen pada produk kopi. Penyangraian menjadi proses pembentukan rasa dan aroma pada kopi dengan mengendalikan keseragaman ukuran, *specific gravity*, tekstur, kadar air, dan struktur kimia (Edvan *et al.* 2016). Faktor kualitas produk dalam penyangraian meliputi suhu sangrai dan lama penyangraian perlu diperhatikan (Fadri *et al.* 2019). Penyangraian akan memengaruhi warna serta aroma akibat reaksi kimia yang terjadi. Namun, proses tersebut dapat menyebabkan degradasi metabolit sekunder akibat pemanasan suhu yang relatif tinggi. Hal ini memungkinkan terjadi penurunan aktivitas antioksidan pada minuman kopi.

Proses penyangraian di lain sisi juga menghasilkan senyawa melanoidin dari reaksi Maillard yang dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan. Penyangraian yang dilakukan pada suhu tinggi (160–250 °C) dapat menyebabkan perubahan komponen kimia seperti polisakarida, gula, dan asam amino yang akan terdegradasi membentuk CO₂, uap air, dan komponen volatil (Lingle 2001).

Penelitian tentang pengaruh proses sangrai terhadap aktivitas antioksidan pada kopi biji carica belum dilakukan. Padahal ini penting dalam pengembangan inovasi produk biji carica dieng sebagai upaya mendukung nilai tambah industri pengolahan carica. Penelitian ini bertujuan Penelitian ini bertujuan menentukan pengaruh proses *roasting* terhadap aktivitas antioksidan dari kopi biji carica (*Carica pubescens*) serta mengetahui korelasinya terhadap reaksi Maillard pada proses *browning*.

METODOLOGI

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi oven, *roaster* kopi merek Shan Yen Machinery Co. Ltd, Taiwan, blender, alumunium foil, ayakan 50 mess, *hot plate*, botol gelap, pipet volumetrik, pipet Mohr, mikropipet, *freeze dryer*, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1240, neraca analitik, peralatan gelas, *water bath*, dan instrumen FTIR. Adapun bahan-bahan yang digunakan terdiri dari biji carica, akuades, HCl pekat, reagen Bouchardad, reagen Mayer, reagen Dragendroff, reagen Folin Ciocalteu, larutan Na_2CO_3 , asam galat, buffer asam, etanol, reagen DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), etanol absolut, buffer asam asetat, larutan FeCl_3 , padatan KBr, diklorometan, metanol, serbuk Mg/Zn, dan standar asam askorbat.

Prosedur Penelitian

Preparasi Sampel Kopi Biji Carica

Sampel biji carica dicuci lalu dikeringkan dengan sinar matahari. Sebanyak 100 gram sampel kering dianalisis proksimat. Biji carica kering disangrai pada level sangrai 100–115°C, 150–165°C, dan 200–215°C selama 20 menit, sedangkan faktor lain dianggap tetap. Setiap level sangrai terdiri dari 7 kelompok penyangraian. Biji yang sudah disangrai selanjutnya dihaluskan menjadi serbuk dengan cara diblender lalu diayak halus. Serbuk kopi carica diseduh dengan 250 mL akuades suhu 85–95°C dan disaring dengan kertas saring khusus kopi, lalu ekstrak air disimpan dalam botol gelap plastik.

Uji Fitokimia Ekstrak Kopi Biji Carica

Uji Alkaloid. Bubuk kopi dari masing-masing sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 mL HCl 2N dan ditambahkan 1 mL akuades. Selanjutnya larutan dipanaskan di dalam penangas selama 15 menit, kemudian didinginkan dan disaring untuk mendapatkan filtrat. Sebanyak 2 tetes filtrat diteteskan pada sumuran pelat tetes dan ditambahkan 2 tetes reagen Bouchardad. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna coklat atau kehitaman. Selanjutnya pada sumuran lain diteteskan 2 tetes filtrat dan ditambahkan reagen Mayer. Hasil positif ditunjukkan dengan endapan berwarna putih. Kemudian pada sumuran lainnya diteteskan 2 tetes filtrat dan ditambahkan reagen Dragendroff. Hasil positif ditunjukkan dengan endapan berwarna jingga.

Uji Flavonoid dan Saponin. Bubuk kopi dari masing-masing sampel dikocok bersama diklorometan selama 15 menit, lalu disaring. Filtrat diuapkan hingga kering, kemudian dilarutkan dalam metanol 50%. Selanjutnya, larutan ditambahkan serbuk logam seng atau magnesium lalu ditambahkan 5–6 tetes HCl pekat dan dipanaskan pada penangas. Positif flavonoid ditunjukkan dengan warna hijau biru. Bubuk kopi dari masing-masing sampel diseduh untuk uji saponin, lalu dikocok kuat-kuat hingga terbentuk busa. Positif saponin ditunjukkan dengan busa stabil selama kurang lebih 10 menit.

Uji Fenol dan Tanin. Bubuk kopi dari masing-masing sampel dikocok bersama metanol lalu diambil filtratnya dan diteteskan pada pelat tetes. Kemudian larutan NaOH 10% ditambahkan untuk uji fenol. Uji tannin dilakukan dengan reagen FeCl_3 5% pada ekstrak seduhan bubuk kopi. Positif fenol dan tannin ditandai dengan adanya perubahan warna ekstrak.

Penentuan Kadar Total Fenol

Pembuatan Deret Standar Asam Galat. Sebanyak 5 mg asam galat dilarutkan dalam 50 mL metanol p.a 95% lalu diaduk hingga homogen, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan induk diencerkan sebagai deret standar asam galat dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm dalam labu takar 5 mL. Masing-masing larutan standar diambil 2 mL untuk analisis dan ditambahkan 500 μL reagen Folin Ciocalteu 0,9 mol/L, 1

mL larutan Na₂CO₃ 20%, dan 5 mL akuades. Larutan diinkubasi di tempat gelap selama 60 menit lalu ditentukan absorbansnya pada panjang gelombang 725 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya diperoleh formula kurva standar untuk menentukan kandungan total fenol sampel yang dinyatakan dalam ekuivalen asam galat/gram bubuk kopi.

Kadar Total Fenol. Sebanyak 0,5 mL ekstrak kopi dari masing-masing sampel ditambahkan 1,5 mL etanol p.a 95% lalu ditambahkan 500 µL reagen Folin Ciocalteu 0,9 mol/L, 1 mL larutan Na₂CO₃ 20%, dan 5 mL akuades. Larutan diinkubasi di tempat gelap selama 60 menit lalu ditentukan absorbansnya pada panjang gelombang 725 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

$$\text{Kadar total fenol} = \frac{V \times C \times FP}{B}$$

Keterangan:

V = volume yang dianalisis (mL)

C = Kadar fenol dari kurva standar (ppm)

FP = Faktor pengenceran

Penentuan Aktivitas Antioksidasi

Pengukuran Deret Standar Asam Askorbat untuk Uji DPPH. Stok larutan DPPH disiapkan dari 24 mg kristal DPPH yang dilarutkan dalam etanol p.a 100 mL, lalu diambil 10 mL dan diencerkan dengan 45 mL etanol p.a. Stok dalam labu takar dilapisi alumunium siap untuk analisis. Selanjutnya stok asam askorbat disiapkan dari 0,1761 g padatan lalu dilarutkan dalam 1 mL DMSO menggunakan sonikasi lalu dihomogenkan dengan vorteks. Sebanyak 1 mL larutan asam askorbat diencerkan dalam 10 mL etanol p.a dan dihomogenkan sehingga diperoleh larutan 100 mM. Larutan 100Mm diambil 0,1 mL dan diencerkan menjadi 1 mM. Stok asam askorbat siap dipakai. Deret standar asam askorbat dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 µM. Masing-masing diambil 150 µL secara triplo dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2850 µL reagen DPPH pada ulangan 1 dan 2, sementara ulangan 3 sebagai kontrol negatif. Selanjutnya, standar diinkubasi 24 jam di tempat gelap lalu ditentukan absorbansnya pada panjang gelombang 515 nm.

Pengukuran Aktivitas Antioksidan Metode DPPH. Masing-masing sampel diambil 150 μL secara triplo dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2850 μL reagen DPPH pada ulangan 1 dan 2, sementara ulangan 3 sebagai kontrol negatif. Selanjutnya, standar diinkubasi 24 jam di tempat gelap lalu ditentukan absorbansnya pada panjang gelombang 515 nm.

Penentuan Gugus Fungsi dengan FTIR

Ekstrak sampel dikering bekukan lalu ditentukan gugus fungsinya dengan FTIR. Penentuan gugus fungsi FTIR secara kualitatif bertujuan untuk mengonfirmasi adanya gugus fungsi senyawa MPRs pada ekstrak kopi biji carica. Sebanyak 10 mg masing-masing bubuk sampel dicampurkan dengan 90 mg KBr lalu dianalisis pada rentang 4000–400 cm^{-1} dengan resolusi 4 cm^{-1} .

Analisis Statistik

Data berupa kadar total fenol dan aktivitas antioksidan yang diperoleh dianalisis dengan *one way analysis of varians* (ANOVA) untuk mengetahui signifikansi antar kelompok pada masing-masing level sangrai. Analisis multivariat klaster metode Ward digunakan untuk mengetahui kedekatan bilangan FTIR antar level penyangraian. Data disajikan dalam bentuk dendogram untuk menjelaskan pengelompokan antar level.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Proksimat Biji Carica Kering dan Kualitatif Fitokimia

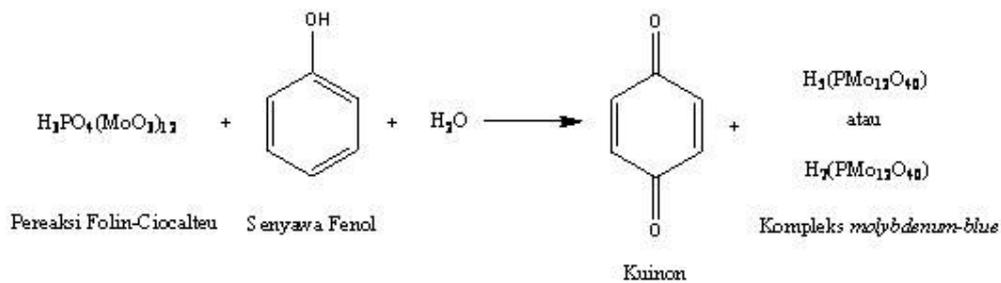
Biji carica kering mengandung kadar air sebesar 6,67 % b/b dan kadar abu 4,12 % b/b (dihitung tiap 100 gram contoh). Kadar air dan kadar abu menjadi syarat mutu kopi sebelum disangrai karena berpengaruh pada sensori dan mutu produk kopi yang dihasilkan. Mengacu standar SNI 01-2907-2008 tentang kopi, kadar air dan abu maksimum sebelum penyangraian 7% dan 5%, artinya biji carica memenuhi standar mutu kopi. Parameter pengujian proksimat lain menunjukkan kadar lemak biji carica sebesar 32,27%, (metode *soxhlet*), kadar protein sebesar 25,67% (protein kasar, metode Kjeldahl), kadar karbohidrat sebesar 31,26% (metode *by difference*).

Uji kualitatif fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya metabolit sekunder pada biji carica yang sudah disangrai pada tiga tingkat suhu yaitu 100–115°C; 150–165°C, dan 200–215°C. Biji Carica Dieng tidak terdeteksi mengandung fenol dan tannin pada semua tingkat suhu sangrai. Sementara pada penelitian Winarno (2015) biji kering carica dieng positif mengandung flavonoid, polifenol, dan tannin. Hal ini menandakan bahwa perlakuan sangrai memberi pengaruh pada kandungan metabolit sekundernya.

Hasil uji flavonoid dan saponin terdeteksi hingga sampel dengan penyangraian suhu 150–165°C. Proses penyangraian dalam biji carica dengan suhu yang cukup tinggi menyebabkan degradasi senyawa bioaktif. Suhu yang tinggi menyebabkan penguraian ikatan antar atom dalam senyawanya. Yuliantari (2017) menyebutkan secara spesifik bahwa proses pemanasan di atas 50 °C dapat mengakibatkan hilangnya aktivitas senyawa yang rentan terhadap suhu. Uji alkaloid menggunakan pereaksi Wagner, Dragendorff, atau Mayer menunjukkan hasil positif pada semua tingkat suhu sangrai.

Kandungan Total Fenol

Senyawa fenol merupakan komponen bioaktif pada tanaman yang disintesis oleh asam sikimat, pentosa fosfat, dan jalur fenilpropanoid (Diniyah dan Lee 2020). Secara struktural fenolik mencakup sejumlah senyawa yang memiliki cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil dan dapat bervariasi dari molekul sederhana hingga molekul kompleks (Haminiuk *et al.* 2012). Senyawa fenolik terbagi menjadi beberapa subkelompok yaitu asam fenolat, flavonoid, tannin, dan stilben berdasarkan jumlah gugus fenolik hidroksil yang melekat dan elemen struktural yang menghubungkan cincin benzena. Senyawa fenolik berkorelasi dengan manfaat sebagai antioksidan. Hal ini karena senyawa fenol dapat memodulasi status oksidatif seluler dan mencegah kerusakan oksidatif seluler molekul biologis seperti DNA, protein, dan membran lipid. Senyawa fenol bertindak sebagai agen pereduksi, peredam elektron singlet, dan donor elektron.



Gambar 1 Reaksi senyawa fenol dengan pereaksi Folin (Khadijah *et al.* 2017)

Metode Folin ciocalteu termasuk cara tradisional dalam menentukan kandungan total fenolik secara kolorimetri (Way *et al.* 2020). Pereaksi Folin ciocalteu bereaksi spesifik dengan polifenol membentuk kompleks berwarna biru yang dapat diukur kadarnya melalui spektrofotometri (Blainski *et al.* 2013). Warna biru pada larutan disebabkan karena pereaksi folin (molibdotungsto-fosfotungstat) mengoksidasi senyawa fenolat menghasilkan kelat molibdenum berwarna biru dan dapat diukur absoransnya hingga panjang gelombang 760 nm (Khadija *et al.* 2017). Pengukuran dengan metode Folin juga memiliki beberapa kelebihan yaitu sederhana, akurat, cepat, serta absorpsi kromofor berada di panjang gelombang tinggi sehingga mengurangi gangguan matriks dari sampel (Sanchez-rangel *et al.* 2013). Standar yang digunakan sebagai kontrol positif

dalam uji fenolik ini yaitu asam galat. Asam galat banyak digunakan sebagai standar dalam penentuan total fenol karena termasuk senyawa murni, stabil, dan mudah bereaksi dengan pereaksi Folin sehingga mudah diamati perubahan warnanya.

Pengujian kadar fenolik terkait dengan kemampuan senyawa fenol dalam mencegah reaksi oksidasi, sehingga sering dikorelasikan dengan aktivitas antioksidan. Banyak dari kelompok senyawa fenol dapat menunjukkan aktivitas antioksidan melalui donor elektron π konjugasi atau atom hidrogen dari gugus hidroksil. Namun, hal ini tergantung pada strukturnya yang meliputi jumlah dan posisi gugus hidroksil pada cincin atau sejauh mana elektron radikal dapat terdelokalisasi ke seluruh molekul (Debede *et al.* 2016). Kandungan total fenolik pada sampel dinyatakan dalam ekuivalen asam galat atau *gallic acid equivalent* (GAE). Kandungan total fenolik menggunakan standar asam galat dengan deret konsentrasi 0, 10, 20, 30, 40, dan 50 mg/L yang direpresentasikan dalam kurva standar konsentrasi terhadap absorbans menghasilkan persamaan $y=0,018x-0,095$.

Tabel 1 menunjukkan data total fenolik seduhan kopi biji carica yang disangrai dalam tiga tingkat suhu. Hasil uji ANOVA kandungan total fenol menunjukkan perbedaan signifikan pada setiap level penyangraian dengan tingkat kepercayaan 5% yang ditandai dengan notasi huruf yang berbeda. Hal ini berarti bahwa rentang suhu pada setiap level memberi pengaruh nyata pada kandungan total fenoliknya. Secara keseluruhan, kandungan total fenol pada semua ulangan sangrai sebesar 3,21 μg GAE/g hingga 8,989 μg GAE/g bubuk kopi biji carica. Kadar total fenol pada penyangraian suhu 150–165 °C lebih rendah dibandingkan dengan penyangraian suhu 100–115 °C. Hal ini karena perlakuan termal pada sampel dapat memengaruhi kestabilan kandungan senyawa fenoliknya. Liazid *et al.* (2007) menginvestigasi kestabilan golongan fenol yang stabil pada pemanasan 100–125°C lalu mengalami degradasi di atas suhu 150 °C. Tingginya kadar total fenol kopi biji carica yang disangrai pada suhu 200–215°C diduga berkaitan dengan terbentuknya produk hasil reaksi Maillard berupa melanoidin yang disinyalir dapat meningkatkan aktivitas antioksidannya (Lemos *et al.* 2012).

Tabel 1 Kadar total fenolik dan aktivitas antioksidan seduhan kopi biji carica

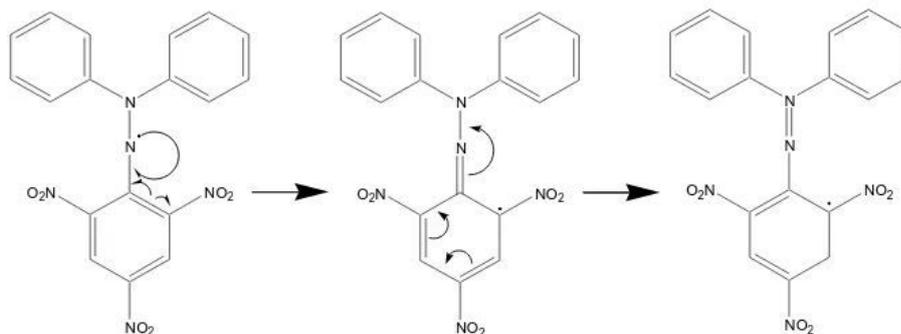
Suhu sangrai (°C)	No sangrai	Total Fenol ($\mu\text{g GAE/g}$ bubuk kopi)	Aktivitas
			Antioksidan (ppm AEAC)
100-115	1	4,138 ^b \pm 0,3455	93,00 ^a \pm 4,71
	2	4,796 ^b \pm 0,7658	92,17 ^a \pm 3,54
	3	5,838 ^b \pm 0,9210	83,00 ^a \pm 2,89
	4	7,075 ^b \pm 0,4868	88,00 ^a \pm 4,71
	5	6,626 ^b \pm 0,5045	88,56 ^a \pm 2,55
	6	5,142 ^b \pm 0,2148	83,00 ^a \pm 2,89
	7	6,125 ^b \pm 0,2584	76,33 ^a \pm 2,36
150-165	1	5,330 ^a \pm 0,5051	211,33 ^b \pm 2,89
	2	3,530 ^a \pm 0,3472	139,67 ^b \pm 4,41
	3	3,210 ^a \pm 0,1212	170,78 ^b \pm 1,92
	4	3,401 ^a \pm 0,1194	158,56 ^b \pm 2,55
	5	3,753 ^a \pm 0,2363	151,33 ^b \pm 1,67
	6	3,967 ^a \pm 0,1401	146,89 ^b \pm 4,19
	7	4,953 ^a \pm 0,8778	210,22 ^b \pm 3,47
200-215	1	7,354 ^c \pm 0,2392	393,00 ^c \pm 3,33
	2	7,433 ^c \pm 0,8354	328,00 ^c \pm 3,33
	3	8,989 ^c \pm 0,1389	425,78 ^c \pm 5,85
	4	3,363 ^c \pm 0,1408	459,67 ^c \pm 5,00
	5	7,291 ^c \pm 0,3685	421,89 ^c \pm 3,85
	6	8,090 ^c \pm 0,3604	390,22 ^c \pm 2,55
	7	7,818 ^c \pm 0,3160	392,44 ^c \pm 1,92

*Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan pada taraf uji ($P < 0,05$) uji Duncan.

Aktivitas Antioksidan

Antioksidan diartikan sebagai senyawa yang dapat menginaktivasi spesi radikal bebas karena bersifat reduktor kuat dan cenderung mudah bereaksi dengan radikal (Mustarichie *et al.* 2017). Kelebihan radikal bebas dalam tubuh berbahaya karena dapat merusak protein, DNA, dan susunan fosfolipid sehingga mengganggu fungsi integrasi spesifik dalam tubuh. Antioksidan dapat diperoleh dari suplemen sintetis atau bahan alami yang mengandung senyawa golongan fenol, flavonoid, karotenoid, asam hidroksiamat, kumarin, tokoferol, dan asam organik. Menurut Singh *et al.* (2020), aktivitas antioksidan dari tanaman keluarga Carica diduga berasal dari kandungan metabolit sekunder berupa asam salisilat, asam p-hidroksibenzoid, senyawa fenolik berupa hiperosid, senyawa antioksidan *gentisyl alcohol*, senyawa ester galat berupa *gallotannin*, dan kaemferol heksosida yang merupakan glukosida flavonol.

Produk hasil reaksi Maillard (MRPs) dari proses penyangraian juga dilaporkan memiliki kemampuan untuk meredam radikal. Hal ini didasarkan pada penelitian Liu *et al.* (2019) tentang aktivitas antioksidan MRPs dari sistem pemodelan gula (glukosa, fruktosa, dan xilosa) dan asam amino (serin, sistin, arginin, dan lisin) pada biji wijen sangrai. Penjelasan lebih lanjut dari DeHond *et al.* (2019) bahwa melanoidin dalam kopi menjadi kontributor penting untuk kapasitas antioksidan. Melanoidin diduga berasal dari interaksi gula-asam amino melalui mekanisme reaksi Maillard. Struktur melanoidin sendiri belum diketahui secara pasti, namun mungkin berbeda-beda tergantung jenis gula, asam amino, dan protein yang terlibat dalam reaksi. MRPs sebagai substruktur kromoforik kemungkinan berasal dari taut silang antar residu asam amino membentuk struktur melanoidin yang berbobot molekul tinggi (Liu dan Kitts 2011).

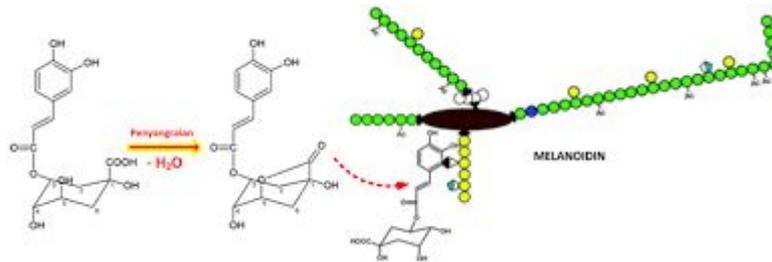


Gambar 2 Reaksi peredaman radikal DPPH (Miranti *et al.* 2016)

Pembentukan melanoidin pada reaksi Maillard diketahui melalui tiga tahap yang diawali dengan pembentukan glikosilamin. Asam amino dan gula pereduksi mengalami kondensasi membentuk N-glikosilamin. Tahap selanjutnya glikosilamin terdehidrasi dan mengalami siklisasi menghasilkan basa Schiff. Selanjutnya terjadi penyusunan kembali menjadi senyawa intermediet Amadori (*Amadori Rearrangement Product*). Kemudian terjadi degradasi Strecker yang melibatkan interaksi asam amino dan senyawa dikarbonil. Tahap akhir reaksi Maillard terjadi reaksi heterosiklisasi membentuk senyawa flavor berbobot molekul tinggi yaitu melanoidin (Gambar 3).

Penentuan aktivitas antioksidan seduhan kopi biji carica dieng dilakukan secara *in vitro* dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil). Prinsip metode ini yaitu pengukuran absorbans larutan antioksidan yang nilainya sebanding dengan peredaman sejumlah elektron radikal DPPH menjadi difenil dipikrihidrazin yang bersifat nonradikal. Senyawa antioksidan memiliki kemampuan mereduksi warna ungu larutan DPPH menjadi kuning. Senyawa antioksidan mendonorkan H⁺ pada DPPH, sehingga terjadi resonansi struktur yang menyebabkan berkurangnya jumlah ikatan rangkap terkonjugasi (Gambar 2). Semakin tinggi aktivitas antioksidannya, warna larutan yang terbentuk semakin kuning atau absorbansnya semakin kecil.

Metode DPPH memiliki keunggulan yaitu sederhana, analisis cepat, mudah, dan sensitivitas tinggi (Wulansari 2018). Pengujian dilakukan pada panjang gelombang 517 nm berupa nilai absorbans yang akan dikoreksi dengan kontrol negatif. Nilai aktivitas antioksidan sampel dibandingkan dengan standar asam askorbat dalam ekuivalen asam askorbat ppm AEAC (*ascorbic acid equivalent antioxidant capacity*). Hasil pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak seduhan kopi biji carica dieng dapat dilihat pada Tabel 1. Nilai kapasitas antioksidan menunjukkan aktivitas sampel dalam meredam radikal yang ekuivalen dengan konsentrasi asam askorbat. Rumus regresi standar asam askorbat $y=0,0006x-0,0138$ dengan determinasi 99,86%. Hasil uji ANOVA antioksidan menunjukkan perbedaan signifikan pada setiap level penyangraian pada tingkat kepercayaan 5% yang ditandai dengan notasi huruf yang berbeda. Hal ini berarti bahwa pada setiap level suhu perlakuan memengaruhi aktivitas antioksidannya.



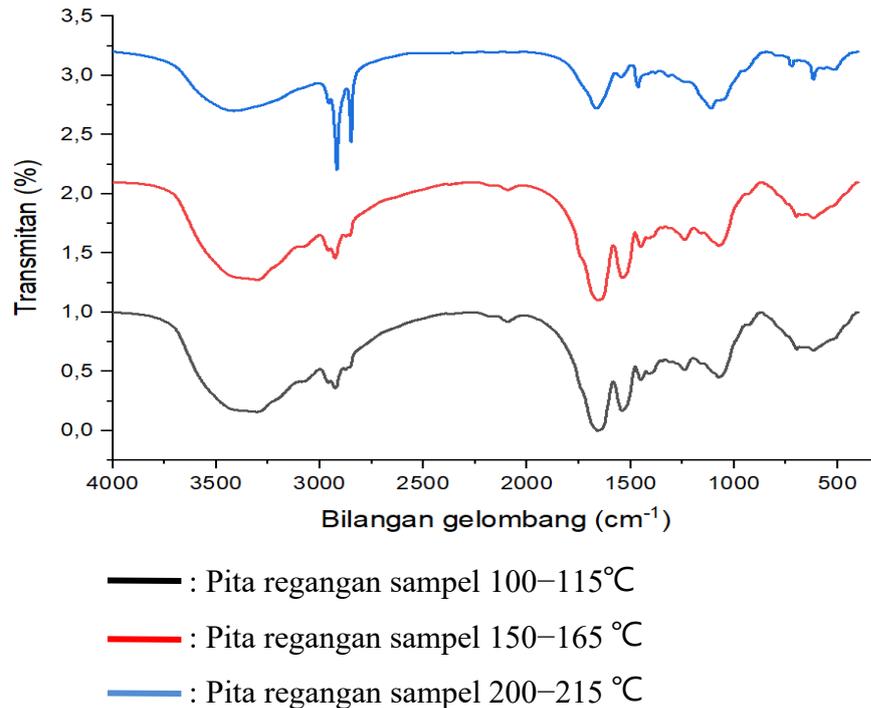
Gambar 3 Struktur senyawa melanoidin

Kapasitas antioksidan ekuivalen asam askorbat seduhan kopi biji carica berkisar antara 83 ppm hingga 459,67 ppm AEAC. Kapasitasnya semakin besar seiring suhu penyangraian. Aktivitas antioksidan sering dikorelasikan dengan kandungan metabolit sekundernya. Data kandungan total fenolik menurun pada suhu sangrai 150–165 °C, lalu naik pada 200–215 °C. Begitu juga pada aktivitas antioksidannya yang tinggi pada suhu sangrai 200–215 °C. Aktivitas antioksidan seduhan kopi biji carica tidak hanya berasal dari senyawa fenoliknya karena dapat terdegradasi pada suhu tinggi, melainkan ada reaksi lainnya. Hustiany (2016) dan Kurniawan *et al.* (2017) menyebutkan bahwa penyangraian menyebabkan pencoklatan (*browning*) atau reaksi Maillard menghasilkan produk senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa melanoidin sebagai MRPs berkontribusi dalam aktivitas antioksidan melalui peredaman radikal peroksil pada pengujian metode ORAC dan ABTS (Liu dan Kitts 2011) serta DPPH (Vignoli *et al.* 2011). Senyawa fenolik dan MRPs juga memiliki aktivitas antioksidan *in vivo* pada pengujian model hepatosit dan makrofag tikus yang terbukti dapat melindungi sel dari stress oksidatif dan inflamasi dengan meningkatkan glutathion serta merangsang ekspresi gen yang terkait dengan seluler sistem antioksidan (Jung *et al.* 2017).

Analisis Gugus Fungsi FTIR

Analisis FTIR dilakukan untuk mengidentifikasi gugus fungsi senyawa dari penyerapan atau emisi zat terhadap spektrum inframerah. Teknik ini sangat berguna dalam identifikasi gugus fungsi senyawa organik dan organometalik. Pengukuran spektrum IR dilakukan pada daerah cahaya inframerah tengah (*mid-*

infrared) yaitu pada panjang gelombang 2,5–50 μm atau bilangan gelombang 4000–200 cm^{-1} . Menurut Dachriyanus (2004), energi yang dihasilkan oleh radiasi elektromagnetik ini menyebabkan getaran atau vibrasi pada molekul. Energi yang terlibat pada vibrasi tergantung pada panjang ikatan dan berat atom-atom yang saling berikatan. Setiap atom yang berbeda akan bervibrasi dengan cara dan jumlah energi yang berbeda pula.



Gambar 4 Spektrum FTIR ekstrak seduhan kopi biji carica

Ikatan-ikatan antar atom pada dasarnya selalu bervibrasi, namun dapat berubah dalam keadaan vibrasi yang lebih tinggi saat diberikan sejumlah energi yang tepat sama. Jumlah energi yang dibutuhkan bervariasi pada setiap ikatan dan akan menyerap energi elektromagnetik yang berbeda-beda. Pita absorpsi inframerah sangat khas dan spesifik untuk setiap tipe ikatan kimia atau gugus fungsi. Sederhanya, ketika suatu frekuensi dari radiasi inframerah dilewatkan pada suatu sampel organik maka akan terjadi penyerapan frekuensi pada senyawa tersebut. Detektor alat akan mendeteksi frekuensi yang diserap sebagai absorbansi atau transmisi cahaya yang tidak diserap sebagai persen transmisi.

Identifikasi setiap absorpsi ikatan yang khas dari gugus fungsi menjadi basis interpretasi spektrum. Penggunaan FTIR terhadap ekstrak kopi biji carica dieng

dimaksudkan untuk mengonfirmasi gugus fungsi senyawa MPRs pada sampel. Gambar 4 menunjukkan gabungan 3 spektrum FTIR ekstrak kopi biji carica. Ekstrak level sangrai 200–215°C tampak memiliki spektrum intensitas transmitans paling rendah, diikuti level 150–165 °C , sementara level sangrai suhu terendah juga memiliki intensitas transmitans paling tinggi. Intensitas transmitans yang tinggi menandakan jumlah molekul berikatan pada sampel lebih sedikit karena perlakuan suhu menyebabkan terputusnya ikatan atau deformasi menjadi senyawa lain (Wendri *et al.* 2020). Ini sebagai dugaan awal terbentuknya senyawa MPRs seiring peningkatan level suhu sangrai.

Berdasarkan spektrum yang dihasilkan, terlihat adanya pita regangan yang lebar dari gugus fungsi –OH pada bilangan gelombang 3303,47 cm⁻¹ untuk sampel dengan level sangrai 100–115°C , dan 3304,37 cm⁻¹ pada level 150–165 °C , serta 3413,84 cm⁻¹ pada level 200–215 °C . Ini juga dikonfirmasi dengan munculnya regangan C–O pada daerah sidik jari 1100–1000 cm⁻¹. Intensitas keseluruhan regangan –OH mendominasi spektrum yang menandakan tingginya kandungan gugus hidroksil pada struktur melanoidin (Mohsin *et al.* 2019). Perbedaan signifikan terlihat pada puncak regangan hidroksil level sangrai 200–215 °C yang lebih tajam dibandingkan level lainnya. Hal ini terkait gugus hidroksil yang berasal dari fenolik terikat pada struktur melanoidin selama penyangraian (Oracz dan Zyzelewicz 2019).

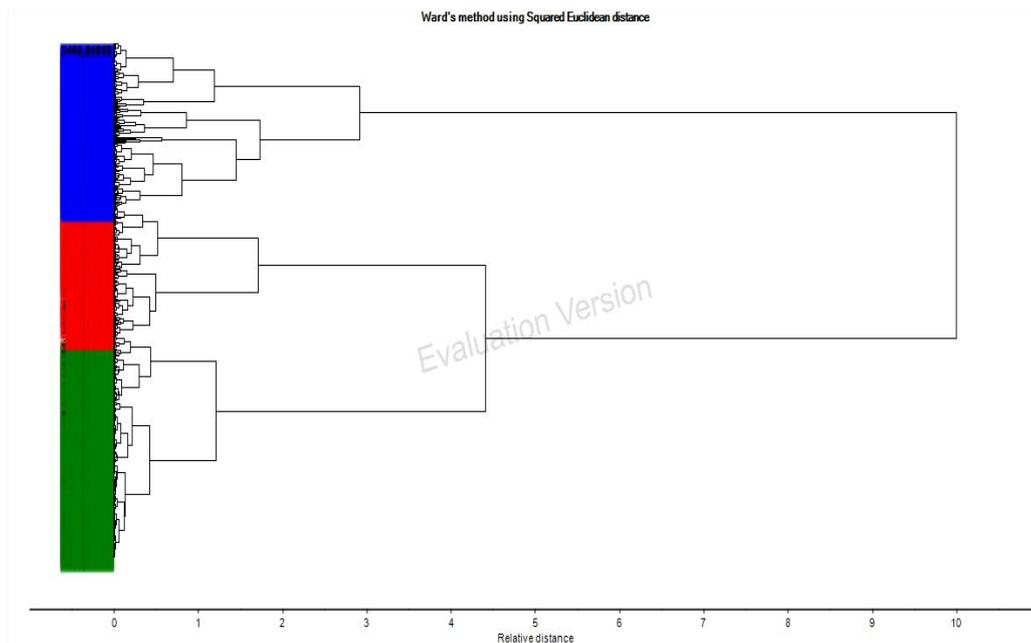
Tabel 2 Gugus fungsi pada seduhan kopi biji carica dieng

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)			Gugus fungsi
100–115°C	150–165 °C	200–215 °C .	
3303,47	3304,37	3413,84	nO-H
2924,05 ; 1459,72	2926,09 ; 1451,36	2956,79 ; 2917,79; 1462,72	nC-H (CH ₂ ,CH ₃)
2092,06	2091,81	-	nC≡C atau nC≡N
1655,94	1655,09	1661,50	nC=O
1539,10	1538,44	1545,44	nC=C aromatik
1238,46	1237,31	-	C-O-H (fenol)
1073,95	1074,46	1109,18	nC-O, nC-C, nC-N

Selanjutnya, gugus fungsi $C\equiv C$ atau $C\equiv N$ tampak pada level sangrai 100–115 °C dan 150–165 °C berturut-turut 2092,06 cm^{-1} dan 2091,81 cm^{-1} , sementara pada level 200–215 °C tidak ditemukan. Hal ini mungkin terjadi akibat perlakuan suhu yang lebih tinggi pada sampel (Mohsin *et al.* 2018). Regangan $C=O$ terlihat dengan intensitas kuat pada ketiga sampel berturut-turut 1655,94 cm^{-1} , 1655,09 cm^{-1} , dan 1661,50 cm^{-1} yang kemungkinan berasal dari gugus $-COOH$. Regangan ikatan rangkap $C=C$ aromatik terlihat pada panjang gelombang 1539,10 cm^{-1} , 1538,44 cm^{-1} , dan 1545,44 cm^{-1} yang pita absorpsinya semakin mereduksi pada kenaikan level sangrai. Rentang bilangan gelombang 1700–1500 cm^{-1} terlihat perubahan struktur karbonil akibat faktor pemanasan yang diduga karena adanya reaksi kondensasi aldol (Mohsin *et al.* 2019). Sedikit bergeser ke arah kanan ditemukan regangan $-CH_2$ masing-masing 1450,72 cm^{-1} , 1451,36 cm^{-1} , dan 1545,44 cm^{-1} .

Analisis Klaster

Analisis multivariat merupakan suatu teknik analisis statistika untuk menganalisis data yang terdiri dari banyak variabel, baik variabel bebas (independen) maupun variabel tidak bebas (dependen). Analisis multivariat memungkinkan adanya analisis pada data lebih dari dua variabel sekaligus. Analisis klaster digunakan untuk mengelompokkan elemen data yang mirip menjadi kelompok yang berbeda dan saling independen. Data yang paling dekat kesamaan karakteristiknya berdasarkan set variabel tertentu berada dalam klaster yang sama. Berbeda dengan analisis multivariat lainnya, analisis klaster tidak mengestimasi set variabel secara empiris melainkan ditentukan oleh peneliti. Cara kerja analisis klaster mencakup tiga hal, yaitu mengenai bagaimana cara mengukur kesamaan antar objek, baik dalam ukuran korelasi, jarak, maupun asosiasi; prosedur pengelompokan objek-objek yang memiliki kesamaan tinggi dalam satu klaster; serta banyaknya klaster yang terbentuk, semakin sedikit klaster maka homogenitasnya akan menurun (Wijaya dan Budiman 2016).



- : Data bilangan gelombang level 100–115°C
- : Data bilangan gelombang level 150–165°C
- : Data bilangan gelombang level 200–215°C

Gambar 5 Dendrogram klusterisasi data FTIR ekstrak kopi biji carica

Klusterisasi pada penelitian ini untuk melihat pengaruh suhu penyangraian terhadap karakteristik spektrum FTIR sampel. Apabila setiap level berbeda kluster, maka diasumsikan bahwa masing-masing level suhu memberikan pengaruh yang berbeda pada kandungan sampel dilihat dari spektrumnya. Metode Ward *linkage* digunakan untuk mengelompokkan objek dalam varians internal sekecil mungkin berdasarkan jarak antara dua kluster pada *sum of square*. Metode ini efektif dan paling sering digunakan dibanding metode lain karena memiliki struktur paling seimbang untuk mereduksi kelompok secara sistematis dan hierarkis (Thamrin dan Wijayanto 2021).

Gambar 5 menunjukkan struktur dendrogram pada data bilangan gelombang FTIR ekstrak kopi biji carica. Pada klusterisasi *divisive* dapat dilihat bahwa awalnya akan terbentuk dua kluster meliputi kluster level penyangraian 100–115 °C (hijau) dan 150–165°C (merah) yang termasuk dalam satu kluster, serta level sangrai 200–215°C (biru) menjadi kluster sendiri. Hal ini berarti bahwa adanya kemiripan bilangan gelombang antara sampel penyangraian suhu 100–115°C dan

150–165°C . Selanjutnya pada klasterisasi 3 kelompok, klaster penyangraian 100–115°C (hijau) dan 150–165°C (merah) terpisah dalam kelompok yang berbeda pada jarak *euclidean* masing-masing 3,23 dan 2,75 satuan, sementara level sangrai 200–215°C terpisah jauh pada jarak 7 satuan. sebesar. *Euclidean distance* (ED) sendiri merupakan panjang segmen garis antar dua titik dalam ruang *euclidean*, sehingga semakin berdekatan jaraknya maka objek-objek tersebut semakin mirip. Level sangrai 200–215°C memiliki karakteristik spektrum yang berbeda jauh dibandingkan level lainnya, sedangkan level 100–115°C dan 150–165°C lebih mirip. Suhu sangrai level 200–215°C memberi pengaruh yang besar pada kandungan senyawanya.

SIMPULAN

Proses penyangraian pada pembuatan kopi biji carica berpengaruh terhadap aktivitas antioksidannya, semakin tinggi level suhu sangrai potensi aktivitas antioksidannya semakin tinggi. Aktivitas antioksidan AEAC ekstrak seduhan kopi biji carica dieng disinyalir berasal dari metabolit sekunder golongan fenolik dan juga senyawa produk reaksi Maillard (MRPs) dari proses penyangraian. Proses sangrai menghasilkan melanoidin sebagai senyawa MPRs yang memiliki kontribusi terhadap aktivitas antioksidan. Hal ini dikonfirmasi melalui spektrum FTIR pada ekstrak kering seduhan kopi biji carica yang menunjukkan adanya penanda gugus fungsi melanoidin. Analisis kedekatan spektrum FTIR dengan klusterisasi metode Ward menunjukkan ada kemiripan antara level sangrai 100–115°C dan 150–165°C dibandingkan level 200–215°C .

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ketua Departemen Kimia FMIPA IPB atas izin yang diberikan dan Program Indofood Riset Nugraha (IRN 2020/2021) untuk hibah yang telah diberikan, serta semua pihak yang terlibat dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Angelia IO. 2018. Uji karakteristik kopi nonkafein dari biji pepaya dengan variasi lama penyangraian. *Journal of Agritech*. 2(1):16–29.
- Blainski A, Lopes GC, Palazzo de Mello JC. 2013. Application and analysis of the Folin-ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*. 18:6852–6865. doi:10.3390/molecules18066852.
- Cordella CBY. 2012. PCA: The basic building block of chemometrics. *Analytical Chemistry*: 1–46. doi: 10.5772/51429.
- DeHond AI, Rmirez B, Escobar FV, Castillo DM. 2019. Antioxidant properties of high molecular weight compounds from coffee roasting and brewing byproducts. *Bioactive Compounds in Health and Disease*. 2(3):48–63. doi:10.31989/bchd.v2i3.588.
- Dachriyanus. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik secara Spektroskopi*. Padang (ID): Lembaga Pengembangan Teknologi dan Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas. ISBN: 978-602-60613-5-5.
- Debebe A, Chandravanshi BS, Abshiro MA. 2016. Total contents of phenolics, flavonoids, tannins, and antioxidant capacity of selected traditional Ethiopian alcoholic beverages. *Bull. Chem. Soc. Ethip*. 30(1):27–37. doi:10.4314/bCse.v30i1.3.
- Diniyah N, Lee SH. 2020. Komposisi senyawa fenol dan potensi dari kacang-kacangan review. *Jurnal Agroteknologi*. 14 (1): 91-102. doi: [10.19184/j-agt.v14i01.17965](https://doi.org/10.19184/j-agt.v14i01.17965).
- Edvan BT, Edison R, Same M. 2016. Pengaruh jenis dan lama penyangraian pada mutu kopi robusta (*Coffee robusta*). *Jurnal Agro Industri Perkebunan*.4(1):31–40.
- Fadri RA, Sayuti K, Nazir N, Suliansyah I. 2019. Review proses penyangraian kopi dan terbentuknya akrilamida yang berhubungan dengan kesehatan. *Journal of Applied Agricultural Science and Technology*.3(1):129–145. doi:10.32530/jaast.v3i1.82.
- Haminiuk CWI, Maciel GM, Maanuel SV, Plata O, Rosaene MD. 2012. Phenolic compound in fruits: a review. *International Journal of Food and Science*. 47 (10):2023-2044. doi: [10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x).
- Hustiany R. 2016. *Reaksi Maillard Pembentuk Citarasa dan Warna pada Produk Pangan*. Bandar Lampung (ID): Lampung Mangkurat University Press. ISBN: 978-602-9092-71-4.
- Ifeanyi OE. 2018. A review on free radicals and antioxidants. *International Journal of Current Research in Medical Sciences*. 4(2): 123–133. doi:10.22192/ijcrms.2018.04.02.019.

- Jung S, Kim MH, Park JH, Jeong Y, Ko KS. 2017. Cellular antioxidant and anti-inflammatory effects of coffee extracts with different roasting levels. *Journal of Medical Food*. 20(6):1–10. doi: 10.1089/jmf.2017.3935.
- [Kemenkes RI] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2020. *Panduan Gizi Seimbang pada Masa Pandemi Covid-19*. Jakarta (ID): Germas.
- Khadijah, Jayali AM, Umar S, Sasmita I. 2017. Penentuan total fenolik dan aktivitas antioksidan ekstrak etanolik daun samama (*Anthocephalus macrophyllus*) asal Ternate, Maluku Utara. *Jurnal Kimia Mulawarman*. 15 (1): 11–19.
- Kurniawan MF, Andarwulan M, Wulandari N, Rafi M. 2017. Metabolomic approach for understanding phenolic compounds and melanoidin roles on antioxidant activity of Indonesia robusta and arabica coffee extracts. *Food Sci Biotechnol*. 2017:1–6. doi: 10.1007/s10068-017-0228-6.
- Lemos MJB, Siqueira EMA, Arruda SF, Zambiasi RC. 2012. The effect of roasting on the phenolic compounds and antioxidant potential of baru nuts [*Dipteryx alata* Vog.]. *Food Research International*. 48:592–597. doi: 10.1016/j.foodres.2012.05.027.
- Liazid A, Palma M, Brigui J, Barroso CG. 2007. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography*. 1140:29–34. doi:10.1016/j.chroma.2006.11.040.
- Lingle TR. 2001. *The Coffee Cupper's Handbook: A Systematic Guide to the Sensory Evaluation of Coffee Flavour*. Washington DC (USA): Ed. Coffee Development Group.
- Liu Y, Kitts D. 2011. Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant of coffee brews. *Food Research International*. 44:2418–2424. doi:10.1016/j.foodres.2010.12.037.
- Liu HM, Han YF, Wang NN, Zheng YZ, Wang XD. 2019. Formation and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from different sugar-amino acid aqueous model system of sesame roasting. *Journal of Oleo Science*. 2019:1–11. doi: 10.5650/jos.ess19336.
- Minarno EB. 2015. Skrining fitokimia dan kandungan total flavonoid pada buah *Carica pubescens* Lenne dan K. Koch di kawasan Bromo, Cangar, dan Dataran Tinggi Dieng. *El-Hayah*. 5(2): 73–82.
- Miranti M, Wardatun S, Fauzi A. 2016. Aktivitas antioksidan minuman jeli sari buah pepaya (*Carica papaya* L.). *Journal Science Technology*. 26(2):211–219. doi: 10.33751/jf.v6i1.753.

- Mohsin GF, Schmitt FJ, Kanzler C, Epping JD, Flemig S, Hornemann A. 2017. Structural characterization of melanoidin formed from d-glucose and l-alanine at different temperatures applying FTIR, NMR, EPR, and MALDI-ToF-MS. *Food Chemistry*. 2017:1–33. doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.115.
- Mohsin GF, Schmitt FJ, Kanzler C, Hoehl A, Hornemann A. 2019. PCA-based identification and differentiation of FTIR data from model melanoidins with specific molecular compositions. *Food Chemistry*. 281:106–113. doi:10.1016/j.foodchem.2018.12.054.
- Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugentholtz A, Feeley M. 2003. Effect of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants*. 20(1):1–30. ISSN:1464-5122.
- Nonier MF, Vivas N, Gaulejac V, Mouche C, Huguet CR, Daugey N. 2018. Purification and partial characterization of melanoidins fractions from toasted oak heartwood, comparison with melanoidins from roasted coffee. *Journal of Food Research*. 7(6):37–58. doi: 10.5539/jfr.v7n6p37.
- Orach J, Zyzelewicz. 2019. In vitro antioxidant activity and FTIR characterization of high-molecular weight melanoidin fractions from different types of cocoa beans. *Antioxidant*. (8) 560:1–16. doi:10.3390/antiox8110560.
- Rafi M, Anggundari WC, Irawadil TT. 2016. Potensi spektroskopi FTIR-ATR dan kemometrik untuk membedakan rambut babi, kambing, dan sapi. *Indonesian Journal of Chemical Science*. 5(3): 229–234. ISSN: 2505-6844.
- Sanchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Zevallos LC, Jacobo-Velazquez DA. 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods*. 5: 5990-5999. doi: 10.1039/c3ay41125g.
- Shafirany MZ, Susilawati Y, Musfiroh I. 2018. Aplikasi kemometrik dalam penentuan mutu tanaman obat. *Pharmauho*. 4(2):6–14. ISSN: 2442-9791.
- Singh PG, Madhu SB, Shailasreesekhar, Gopenath TS, Basalingappa KM, Sushma BV. 2020. In-vitro antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activity of *Carica papaya* seeds. *Global Journal of Medical Research Pharma, Drug Discovery, Toxicology, and Medicine*. 20(2):18–38. ISSN: 2249-4618.
- Siswanto, Budisetyawati, Ernawati F. 2013. Peran beberapa zat gizi mikro dalam sistem imunitas. *Gizi Indon*. 36(1):57–64.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2008. *Biji Kopi*. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.

- Thamrin N, Wijayanto AW. 2021. Comparison of soft and hard clustering: a case study on welfare level in cities on Java Island. *Indonesian Journal of Statistics and Its Applications*. 5(1):141–160. doi:10.29244/ijsa.v5i1p141-160.
- Vignoli JA, Bassoli DG, Benassi MT. 2011. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*. 124: 863–868. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.008.
- Way ML, Jones JE, Nichols DS, Damberg RG, Swarts ND. 2020. A comparison of laboratory analysis methods for total phenolic content of cider. *Beverages*. 6(55):1–11. doi:10.3390/beverages6030055.
- Wendri N, Krisandi A, Irawan IGPY. 2020. Pengaruh temperatur pembakaran keramik terhadap karakteristik spektrum emisi (LIBS) Al dan transmitans (FTIR) pada bodi keramik tipe BL-1. *Buletin Fisika*. 20(2):60–66.
- Wulansari AN. 2018. Alternatif cantigi ungu (*Vaccinium varingiaefolium*) sebagai antioksidan alami: review. *Farmaka Suplemen*. 16(2): 419–429.
- Yuliantari NWA, Widarta IWR, Permana IGDM. 2017. Pengaruh suhu dan waktu ekstraksi terhadap kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan daun sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal Teknologi Pangan*. 4(1):35-42.
- Wijaya T, Budiman S. 2016. *Analisis Multivariat untuk Penelitian Manajemen*. Bantul (ID): Pohon Cahaya. ISBN: 978-602-6336-12-5.