



Analisis HPLC Bertarget dan Tidak Bertarget Produk Berbasis Kopi sebagai Alat Efektif untuk Mengevaluasi Keaslian Kopi : Literature Riview Article

Ermi Abriyani^{1*} Rini Ernawati Sari^{2*} Anasthasya Faomasi Gulo^{3*}
Amanda Auliya Zulfa^{4*} Sri Marita^{5*}

^{1,2,3,4,5} Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang

Abstract

Received: 23 Januari 2023
Revised: 29 Januari 2023
Accepted: 13 Februari 2023

Coffee is a very popular beverage worldwide. However, its composition and characteristics are affected by a number of factors, such as geographical and botanical origin, harvesting and roasting conditions, and brewing method used. As coffee consumption rises, the demands on its high quality and authenticity naturally grows as well. Unfortunately, at the same time, various tricks of coffee adulteration occur more frequently, with the intention of quick economic profit. Many analytical methods have already been developed to verify the coffee authenticity, in which the high-performance liquid chromatography (HPLC) plays a crucial role, especially thanks to its high selectivity and sensitivity. Thus, this review summarizes the results of targeted and non-targeted HPLC analysis of coffee-based products over the last 10 years as an effective tool for determining coffee composition, which can help to reveal potential forgeries and non-compliance with good manufacturing practice, and subsequently protects consumers from buying overpriced low-quality product. The advantages and drawbacks of the targeted analysis are specified and contrasted with those of the non-targeted HPLC fingerprints, which simply consider the chemical profile of the sample, regardless of the determination of individual compounds present.

Keywords: targeted analysis; non-targeted fingerprint; HPLC

(*) Corresponding Author: fm20.rinisari@mhs.ubpkarawang.ac.id,
fm20.anasthasyagulo@mhs.ubpkarawang.ac.id,
fm20.amandazulfa@mhs.ubpkarawang.ac.id,
fm20.srimarita@mhs.ubpkarawang.ac.id

How to Cite: Arbiyani, E., Sari, R., Gulo, A., Zulfa, A., & Marita, S. (2023). Analisis HPLC Bertarget dan Tidak Bertarget Produk Berbasis Kopi sebagai Alat Efektif untuk Mengevaluasi Keaslian Kopi : Literature Riview Article. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 9(5), 184-200. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7732509>

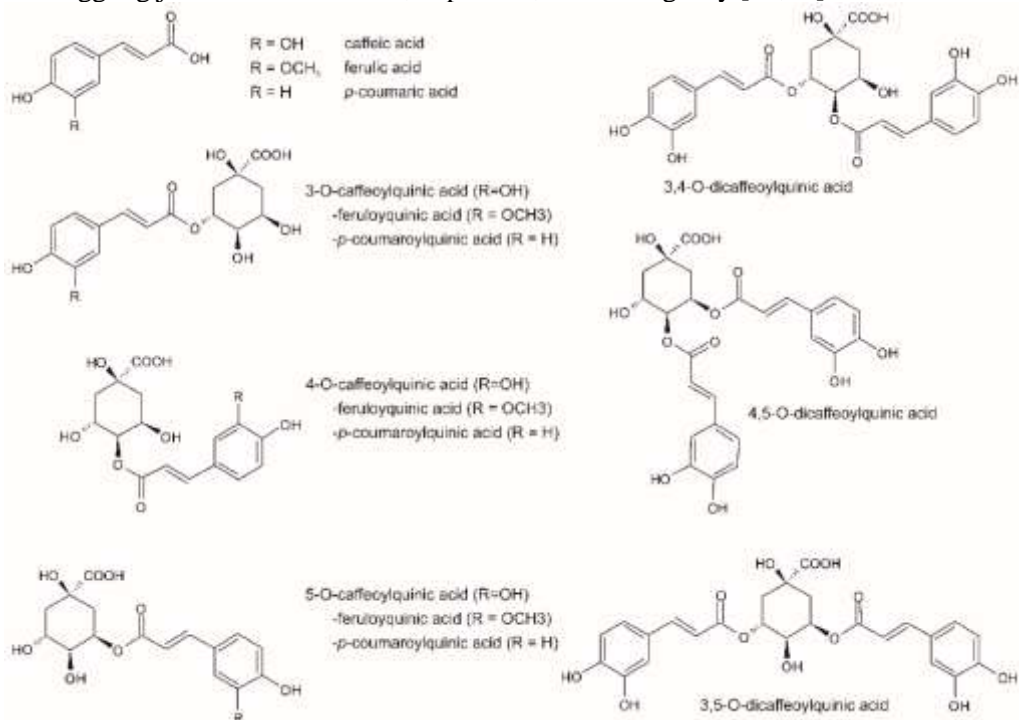
PENDAHULUAN

Pohon kopi termasuk dalam genus *Coffea* dari keluarga Rubiaceae, termasuk lebih dari 100 spesies, dimana *Coffea Arabica* (*Arabica*) dan *Coffea Canephora* (*Robusta*) adalah yang paling banyak dikonsumsi, dan karenanya paling penting secara ekonomi [1,2,3]. *Arabica* berbeda dari *Robusta* dalam beberapa aspek, seperti morfologi, ukuran dan warna biji, komposisi kimia, dan sifat sensoris [4,5,6], serta sifat tumbuh, budidaya, dan pembuatan bir [7]. *Robusta* memberikan tubuh dan busa yang sangat baik, lebih kaya akan asam klorogenat, dan mengandung kafein sekitar 40-50% lebih banyak daripada *Arabica*, yang menyumbang 65% dari produksi global, lebih asam, kurang pahit, dan memiliki rasa yang lebih halus dan jelas. dan aroma [7,8,9,10,11]. Untuk alasan ini, *Arabica* jauh lebih dihargai oleh konsumen kopi, sehingga harga pasarnya sekitar 20-25% lebih tinggi dibandingkan *Robusta* [12]. Pohon kopi ditanam di sekitar 60 negara di



seluruh dunia, yang merupakan barang ekonomi penting [13,14]. Biji kopi telah dianggap sebagai salah satu produk makanan terpenting, memainkan berbagai peran dalam masalah ekonomi, politik, dan agama sejak dahulu kala [15]. Total produksi global mereka adalah 9,7 juta ton per tahun yang luar biasa [16], dengan sekitar 70% produksi kopi hanya berasal dari tiga negara, yaitu Brasil, Vietnam, dan Kolombia [2,17]. Produksi biji kopi berkualitas tinggi tidak hanya bergantung pada operasi panen dan pascapanen, tetapi juga memerlukan pilihan yang tepat dari area tumbuh masing-masing kultivar (iklim, tanah, ketinggian, dll.) serta penanaman dan penyimpanan biji yang tepat. [18,19,20].

Profil fitokimia biji kopi hijau saat ini diketahui sangat kompleks dan memberikan berbagai manfaat kesehatan [21,22]. Kopi telah dihargai selama bertahun-tahun karena efek stimulasinya pada sistem saraf pusat, terutama terkait dengan kafein [23,24,25]. Namun demikian, penelitian menunjukkan bahwa konsumsi dua hingga tiga cangkir kopi sehari membawa banyak manfaat kesehatan potensial lainnya, termasuk pencegahan kanker, diabetes tipe 2, penyakit kardiovaskular dan hati, serta penyakit Alzheimer dan Parkinson [24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34]. Selain kafein, senyawa bioaktif paling penting yang bertanggung jawab atas efek ini terutama polifenol [21,35,36,37], di mana ester asam caffeic dan quinic, yang dikenal sebagai isomer asam klorogenat, adalah yang paling melimpah [23,24]. Sementara asam caffeic memiliki efek antikanker [38], asam chlorogenic (CGA, Gambar 1), termasuk isomer caffeoylquinic (CafQA), dicaffeoylquinic (diCafQA), feruloylquinic (FQA), dan asam p-coumaroylquinic (pCoQA), menunjukkan antibakteri, sifat antijamur, antivirus, antioksidan, dan kemoprotektif [34,39,40]. Polifenol kopi, bersama dengan kafein, juga menyeimbangkan kolesterol dan aritmia, mengurangi oksidasi lipid dan risiko obesitas, hipertensi, hiperglikemia, atau gagal jantung dan hati [30,41,42,43,44,45]. Namun, kafein juga dikaitkan dengan iritasi lambung, insomnia, serta peningkatan pernapasan dan detak jantung [34]. Mengenai karakteristik organoleptik minuman kopi, polifenol dianggap bertanggung jawab atas keasaman, kepahitan, dan astringency [46,47].



Gambar 1. Struktur asam klorogenat yang ada dalam kopi.

Sifat organoleptik khas kopi muncul hanya selama pemanggangan biji kopi hijau. Dalam proses pemanggangan standar, suhu dan rentang waktu masing-masing antara 180–250 °C dan 2–25 menit, bergantung pada tingkat pemanggangan yang diperlukan dan teknik yang digunakan [48]. Memanggang adalah proses yang sangat kompleks di mana reaksi kimia yang tak terhitung jumlahnya terjadi (misalnya reaksi Maillard dan Strecker, diikuti oleh epimerisasi, dekarboksilasi, laktonisasi, dan dehidrasi), yang secara mendasar mengubah komposisi kimia biji kopi (misalnya, perubahan konsentrasi) molekul tertentu dan/atau pembentukan yang baru dan benar-benar berbeda), dan dengan demikian juga rasa, tekstur, dan aroma cangkir kopi [3,11,49,50,51,52]. Reaksi Maillard, yaitu reaksi antara gula pereduksi dan asam amino bebas atau peptida yang terjadi pada suhu tinggi, memunculkan kelas penting senyawa polimer coklat yang disebut melanoidin, yang berkontribusi pada warna khas, aroma khas, dan rasa pahit kopi yang menyenangkan. kacang [46,53,54]. Dekomposisi termal karbohidrat juga mengarah pada pembentukan 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF), yang merupakan indikator kerusakan kopi yang disebabkan oleh waktu dan/atau suhu pemanggangan yang berlebihan atau penyimpanan kopi yang lama [18,55]. Meskipun 5-HMF memiliki sifat karsinogenik, namun tidak menimbulkan risiko bagi konsumen karena jumlahnya yang tidak berbahaya dalam kopi [56].

Minuman kopi disiapkan dengan infus biji kopi bubuk panggang dan, karena sifat organoleptik dan efek stimulasinya, dikonsumsi oleh jutaan orang di seluruh dunia setiap hari. Kopi saat ini merupakan salah satu produk makanan yang paling banyak dikonsumsi, dan karenanya telah menjadi bagian dari budaya kita sehari-hari [1,15]. Sementara rasa, yang digambarkan sebagai kombinasi seimbang antara tubuh, aroma, dan rasa tanpa cacat, merupakan parameter penting bagi konsumen biasa [57], juru cupper ahli yang terlatih di laboratorium terakreditasi mengevaluasi sifat kualitas kopi dari beberapa faktor (berdasarkan skala penilaian yang dikembangkan oleh American Specialized Coffee Association). Mereka fokus tidak hanya pada aroma bubuk dan aroma kopi, intensitas, keasaman, kepahitan, astringency, dan body minuman akhir, tetapi juga pada keberadaan biji kopi yang rusak termasuk hijau (mentah), gosong, hitam (disebabkan oleh fermentasi dan/atau panen yang tertunda), hitam-hijau (biji dengan lapisan perak yang melekat akibat pengeringan pada suhu tinggi), biji pecah atau rusak karena serangga (terutama karena kumbang penggerek kopi), serta terjadinya potensi kontaminan, seperti sisa-sisa tanaman, batu, gumpalan, atau batang [58,59].

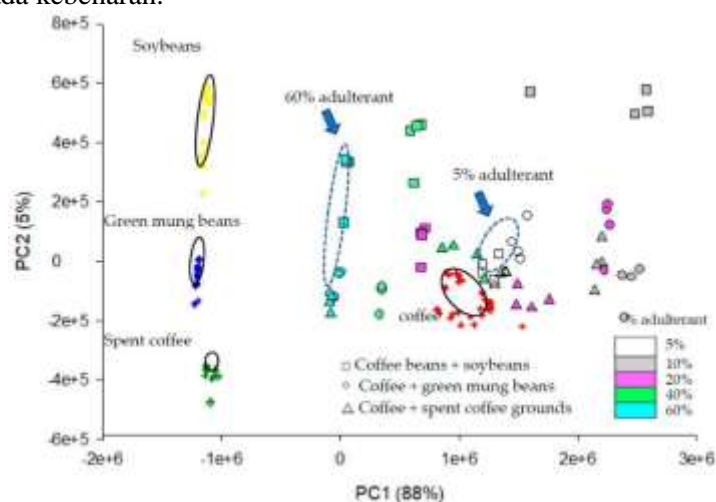
Biji kopi hijau sebagian besar terdiri dari karbohidrat, yang menempati hingga 60% bahan kering. Lipid (8-18%) dan protein (9-16%), termasuk peptida dan asam amino, hadir dalam jumlah yang lebih rendah [33]. Secara umum diklaim bahwa kopi mengandung zat dari lebih dari 1000 kelas kimia yang berbeda (1500 bahan kimia, 850 volatil, dan 700 senyawa terlarut). Namun, representasi dan kuantitasnya yang tepat bergantung pada banyak variabel, seperti genotipe pohon kopi dan kondisi pertumbuhannya (ditentukan oleh tanah, iklim, ketinggian, dan faktor lainnya), metode pemrosesan pascapanen, tingkat kehijauan. penyangraian biji kopi, kondisi penyimpanan dan distribusi, serta cara penyeduhan kopi [13,20,21,24,44,47,60,61,62]. Banyak penelitian telah dipublikasikan di mana elemen [63,64,65,66,67,68,69,70,71], trigliserida [72], tokoferol [62,72,73,74], trigonelline [18,75,76,77,78,79], diterpen [80,81,82], karbohidrat [76,83,84,85,86,87], polifenol [36,37,39,65,75,76,77,78,88,89,90,91,92,93,94,95], 5-HMF [18,55,56], amina biogenik [79], asam amino [13,76,96], asam lemak [65,75,97,98,99], senyawa volatil [10], dan methylxanthines, terutama kafein [18,76,77,78,79,88,90,94,95], telah ditentukan dengan berbagai metode analitik untuk memverifikasi keaslian dan kualitas kopi.

Menurut Komisi Eropa, produk makanan dipalsukan jika komposisi dan/atau kualitasnya tidak sesuai dengan deskripsi atau labelnya [100]. Produk makanan yang

dipalsukan biasanya tidak berbahaya bagi kesehatan (kadang-kadang bahkan nilai gizinya bisa meningkat), tetapi konsumen memiliki hak untuk mengetahui apa sebenarnya yang mereka beli dan konsumsi. Selain itu, potensi risiko alergi makanan yang disebabkan oleh bahan tambahan harus dipertimbangkan [15].

Kopi telah dipalsukan sejak dahulu kala dan saat ini bahkan menempati urutan teratas dalam daftar makanan yang paling banyak dipalsukan [101]. Metode pemalsuan kopi yang sangat umum adalah mencampurkan biji kopi yang memiliki nilai ekonomi berbeda. Oleh karena itu, penambahan Robusta yang lebih murah ke Arabika yang tidak diumumkan, dan dengan demikian ilegal, dianggap sebagai penipuan. Oleh karena itu, banyak peneliti yang berhasil mempelajari perbedaan antara Arabika dan Robusta dalam campuran kopi [1,5,10,12,62,65,72,73,76,77,79,80,90,96,97,98,99,102,103,104,105]. Karena kualitas kopi terkait dengan area penanaman tertentu, indikasi geografis yang salah juga dianggap ilegal dan telah diverifikasi oleh beberapa tim ilmuwan [10,63,65,66,70,75,91,92,94,106,107,108]. Cara umum pemalsuan kopi yang terakhir adalah pencampuran kopi sangrai dengan bahan yang tidak dideklarasikan. Daftar pemalsuan kopi sangat panjang dan mencakup sekam dan batang kopi yang dipanggang dan tidak disangrai, sereal (misalnya sawi putih, jagung, jelai, gandum, gandum hitam, oat, beras, soba, triticale, dedak, dan malt), polong-polongan (misalnya, kedelai, kacang polong, buncis, dan carob), akar (misalnya sawi putih atau dandelion), sayuran (misalnya kentang, wortel, dan bit), buah-buahan (misalnya buah ara, pisang, acai, dan plum), kacang-kacangan (misalnya kacang almond, kacang tanah, dan chestnut), dan biji-bijian (terutama kakao dan biji bunga matahari). Beberapa teknik juga telah dikembangkan untuk mendeteksi pengotor ini [10,15,83,84,85,86,87,107,109,110,111,112,113,114]. Seperti yang ditunjukkan, praktik pemalsuan beragam dan mencakup banyak trik untuk mengurangi biaya produksi sehingga meningkatkan keuntungan dari produk akhir [112.115.116].

Namun, produk kopi yang tercemar tidak hanya menyesatkan konsumen, tetapi juga dapat mempengaruhi kesehatan mereka [84,86]. Oleh karena itu, sangat penting bahwa teknik analisis dapat mendeteksi berbagai bentuk pemalsuan (penggunaan biji kopi berkualitas rendah, seperti mentah, gosong, cacat, dll. [10], keberadaan pemalsuan spesifik (Gambar 2), derajat pengenceran, dan penggunaan yang tidak sah dari asal geografis biji kopi [112,115,116]) untuk menemukan apakah klaim label produk didasarkan pada kebenaran.



Gambar 2. Membedakan biji kopi dari kedelai, kacang hijau, ampas kopi bekas dan kopi yang dipalsukan yang mengandung bahan campuran yang berbeda dalam rasio pencampuran yang berbeda (5%, 10%, 20%, 40%, dan 60%) menggunakan PCA [123].

Produk Sampingan Industri Kopi

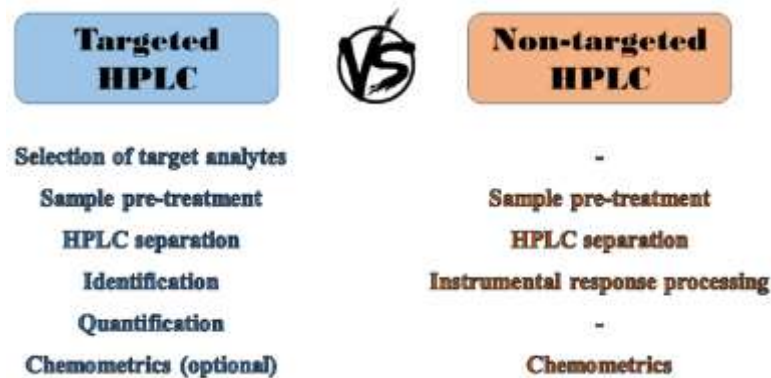
Sudah pernah dibahas dan ditekankan mengapa penting untuk meneliti biji kopi atau seduhan kopi. Namun, bisnis kopi menghasilkan limbah dalam jumlah besar setiap hari, yang bertentangan dengan tren keberlanjutan global akhir-akhir ini. Oleh karena itu, produk sampingan industri kopi saat ini menjadi subjek penelitian ekstensif, terutama untuk aplikasi potensial di masa depan yang dapat mengurangi efek berbahaya industri terhadap lingkungan [32.126]. Akibatnya, banyak penelitian menyelidiki komposisi kimia dan aplikasi potensial dari limbah kopi, seperti ampas kopi bekas [22.121.127.128.129.130.131], ampas kopi [132.133], kulit perak kopi [40.129.134], dan daun kopi [135] (Gambar 3), telah dilakukan. Studi menunjukkan bahwa produk sampingan dari industri kopi masih mengandung sejumlah besar bahan berharga, terutama senyawa kafein dan fenolik, yang biasanya diekstrak dan digunakan sebagai bahan tambahan dalam makanan (suplemen olahraga, makanan fungsional, dan bahan tambahan makanan), kosmetik, dan industri farmasi.



Gambar 3. Anatomi buah kopi.

Analisis Antioksidan Pada Produk Kopi Menggunakan HPLC

Menentukan kualitas kopi masih menjadi isu yang sangat aktual, terbukti dari beberapa review yang diterbitkan mengenai topik ini dalam beberapa tahun terakhir. Namun, sebagian besar dari mereka berurusan dengan ringkasan berbagai pendekatan analitik yang digunakan untuk mengidentifikasi dan mengukur berbagai analit, yang pada akhirnya mengarah pada pengungkapan praktik terlarang dan tidak sah [7,10,13,15,21,51,59,61,112,116,122,136]. Dari sekian banyak analit yang ada dalam kopi, ulasan ini secara eksklusif difokuskan pada penentuan antioksidan terpenting, yaitu senyawa fenolik (PPs) dan kafein, yang umumnya paling dihargai, dianalisis, dan dibahas karena kandungan dan profilnya dapat digunakan untuk penilaian kualitas kopi [11,34,88,137,138,139]. HPLC adalah teknik yang paling umum untuk analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa ini. Dengan demikian, ikhtisar berikut merangkum hasil dari strategi terbaru yang telah dikembangkan dan diterapkan hanya untuk analisis HPLC dari analit ini selama 10 tahun terakhir, dan membandingkan analisis target dengan metode analisis non-target modern yang semakin banyak digunakan, yang tampaknya menjadi lebih murah, lebih cepat, dan sangat efektif (Gambar 4).



Gambar 4. Diagram dasar proses analisis target dan non target.

Preparasi Sampel

Sebelum analisis kromatografi, sampel biji kopi hijau, serta biji kopi sangrai, harus selalu digiling menjadi bubuk sehingga analit target dapat diekstrak selanjutnya. Permukaan kontak, ukuran partikel, berat saringan, teknik ekstraksi yang digunakan, serta waktu, suhu, dan tekanan ekstraksi, merupakan variabel ekstraksi yang paling signifikan [59]. Bergantung pada analit, berbagai metode ekstraksi telah dikembangkan. Infus padat-cair sederhana menggunakan air panas [11,34,47,59,88,139,140,141,142,143] atau pelarut organik [40,78,124,144] adalah teknik isolasi PP dan kafein yang paling umum. Teknik ekstraksi lainnya, yaitu perkolasi [145], ekstraksi berbantuan ultrasound [78.138.146] atau ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro [138], QuEChERS [78], dan ekstraksi berbasis pelarut eutektik dalam [95] jarang digunakan. Karena metode penyeduhan kopi memainkan peran penting dalam komposisi dan khasiat kesehatan dari minuman yang dihasilkan, banyak penelitian yang membahas masalah ini telah dipublikasikan [11.142.147.148.149].

Dalam studi Budryn et al. [147], pengaruh genotipe kopi (Arabika vs. Robusta) terhadap efisiensi berbagai metode ekstraksi (menyeduh dengan air mendidih dan merebus dalam air pada tekanan normal dan tinggi) diselidiki. Metode ekstraksi yang paling efisien dari isomer asam klorogenat dari biji kopi hijau Arabika dan Robusta yang dihaluskan masing-masing direbus dengan air pada tekanan normal dan tekanan tinggi. Karena kopi saring adalah salah satu metode penyeduhan kopi yang paling banyak digunakan, dan kopi espresso (minuman kopi yang dibuat dengan metode tekanan) adalah yang paling disukai oleh konsumen, Ludwig et al. [148] membandingkan kedua metode persiapan ini.

Telah ditunjukkan bahwa dalam pembuatan espresso lebih dari 70% antioksidan, terutama isomer asam klorogenat, diekstraksi dari bubuk kopi dalam delapan detik pertama, sedangkan dalam pembuatan kopi saring, ekstraksi dimulai setelah 75 detik. Dalam studi oleh Rothwell et al. [149], profil kimia dari 76 sampel kopi seduh yang mewakili tidak hanya berbagai metode penyeduhan (kopi instan klasik, espresso, pod K-cup, kopi rebus Turki dan Yunani, mesin tetes, French Press, perkolator, dan metode pembuatan bir dingin), tetapi juga genotipe kacang yang berbeda (campuran Arabika dan Arabika/Robusta), tingkat pemanggangan (terang, sedang, dan gelap), dan versi tanpa kafein, diselidiki menggunakan HPLC digabungkan dengan spektrometri massa (HPLC-MS), diikuti dengan analisis komponen utama (PCA). Terbukti bahwa komposisi kopi sangat dipengaruhi oleh semua variabel yang disebutkan di atas, dengan metode penyeduhan menjadi sumber utama variabilitas kimia. Metode filtrasi dan moka dibandingkan dalam penelitian oleh Bobková et al. [11] dalam hal kandungan isomer asam klorogenat dan kafein. Dalam penelitian ini, semua sampel adalah biji kopi arabika yang disangrai pada tingkat medium-dark. Ditemukan bahwa ada perbedaan kandungan kafein yang signifikan antara sampel yang dianalisis, sedangkan perubahan kandungan

asam klorogenat tidak signifikan secara statistik. Dalam studi oleh Milek et al. [142], pengaruh metode pembuatan bir yang berbeda (aeropress, mocca yaitu, perkolator, dan dripper) pada kapasitas antioksidan dan kandungan kafein dari infus yang dihasilkan juga diuji untuk dua kopi pilihan berkualitas tinggi. Ditemukan bahwa penggunaan dripper memberikan minuman dengan sifat antioksidan terbaik, namun dengan konsentrasi kafein yang rendah.

Analisis Yang Ditargetkan

HPLC dengan deteksi spektrofotometri (HPLC-UV/VIS), dikombinasikan dengan perlakuan data multivariat, digunakan untuk membedakan antara biji kopi spesial dan tradisional dalam penelitian oleh Alcantara et al. [47]. Dengan menggunakan PCA, ketujuh belas sampel berhasil dibagi menjadi dua kelompok (khusus versus kopi tradisional) sesuai dengan jumlah kafein, klorogenat, nikotinat, dan asam caffeic. Pengakuan sampel ini berguna untuk perlindungan konsumen karena kopi tradisional memiliki kualitas yang lebih rendah dan, oleh karena itu, dapat dibeli dengan lebih murah. Perbedaan utama adalah jumlah dan jumlah senyawa yang bertanggung jawab atas sifat organoleptik kopi. Kopi tradisional, biasanya mewakili campuran Arabika dan Robusta, mengandung kafein lebih tinggi dan kandungan polifenol lebih rendah daripada kopi spesial, yang biasanya terdiri dari 100% Arabika seluruhnya dan dipanggang pada tingkat yang lebih rendah, menghasilkan lebih sedikit degradasi zat aktif biologis dan, akibatnya, lebih sedikit kehilangan sifat sensorik.

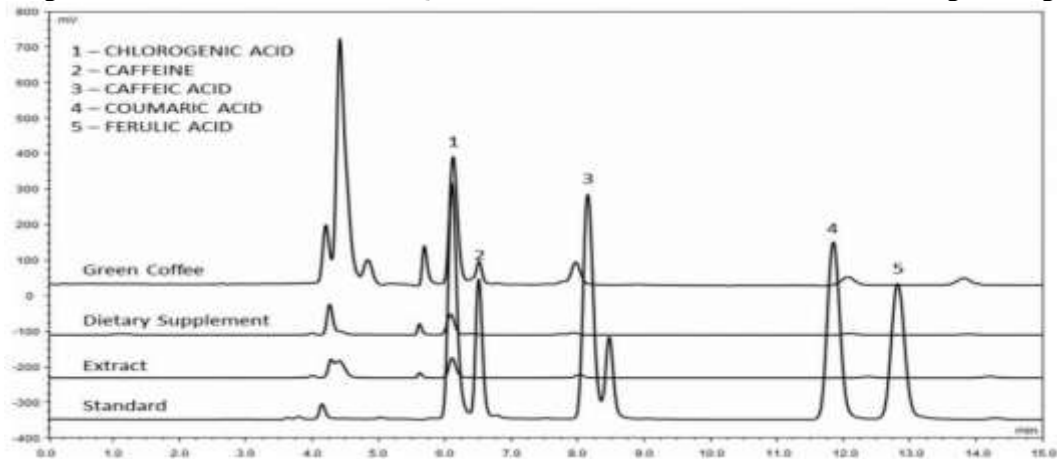
Perbandingan jenis kopi spesial dari botani dan asal geografis yang berbeda (tujuh sampel Arabika dan satu sampel Robusta) dengan merek kopi komersial (dua sampel) dalam hal konsentrasi kafein, kapasitas antioksidan (ditentukan dengan metode spektrofotometri DPPH dan FRAP), dan fenolik total konten (ditentukan dengan metode Folin-Ciocalteu) juga dilakukan dalam penelitian oleh Milek et al. [142]. Selain HPLC-UV/VIS, metode referensi spektrofotometri digunakan untuk penentuan kafein, yang didasarkan pada isolasi kafein dari infus alkali dengan ekstraksi cair-cair ke dalam kloroform. Hasil spektrofotometri lebih rendah daripada yang diperoleh dengan HPLC karena ekstraksi kafein yang tidak lengkap ke dalam kloroform. Kandungan kafein kopi spesial mirip dengan kopi komersial. Di sisi lain, kapasitas antioksidan secara signifikan lebih tinggi pada kopi spesial. Mengenai perbedaan antara sampel kelas khusus, kopi Arabika memberikan variabilitas kafein yang besar, tetapi konsentrasinya selalu lebih rendah daripada kopi Robusta. Selanjutnya, dampak dari metode penyeduhan (aeropress, mocha, dan dripper) pada aktivitas antioksidan dan kandungan kafein dalam penyeduhan akhir diuji untuk dua kopi pilihan berkualitas tinggi. Ditemukan bahwa dripper menghasilkan minuman dengan sifat antioksidan terbaik dan tingkat kafein sedang.

Tujuan penelitian Muchtaridi et al. [34] adalah untuk menentukan kadar kafein dan isomer CafQA dalam biji kopi dari tiga daerah berbeda di Jawa Barat sebelum dan sesudah dekafeinasinya. Dekafeinasi dilakukan dengan mengekstraksi bubuk kopi dengan diklorometana, dilanjutkan dengan ekstraksi fase padat menjadi metanol. Kemudian, sampel tanpa kafein dianalisis menggunakan HPLC-UV/VIS dan juga dilakukan uji pengikatan neuraminidase untuk menentukan aktivitas biologisnya. Tingkat kafein dan CafQA ditemukan mempengaruhi aktivitas penghambatan neuraminidase, dan dengan demikian ada korelasi antara parameter ini.

Efisiensi proses dekafeinasi dan pengaruhnya terhadap kandungan tiga isomer CafQA yang paling melimpah juga dipelajari oleh Klikarová et al. [88]. Penulis membuktikan bahwa diklorometana adalah pelarut ekstraksi terbaik, menghasilkan isolasi kafein paling efektif dengan sedikit kehilangan isomer CafQA. Selanjutnya, dampak dari proses pemanggangan juga dinilai, dan sejumlah besar sampel (total 64 biji kopi biasa (tidak) dipanggang dan tanpa kafein (tidak) dipanggang) menjadi sasaran analisis. Ditemukan bahwa konsentrasi kafein hampir tidak terpengaruh oleh proses

pemanggangan, sedangkan kehilangan 5-CafQA yang signifikan (65-81%) diamati. Konsentrasi dua isomer asam klorogenat lainnya tidak banyak berubah selama pemanggangan biji kopi, bahkan ketika disangrai sampai tingkat gelap. Perlu disebutkan bahwa ini adalah pertama kalinya analisis HPLC-UV/VIS dari analit target ini dilakukan secara bersamaan, bahkan hanya dalam pemisahan isokratik enam menit di mana resolusi puncak unit minimal tercapai.

Penentuan asal biji kopi Amerika, Afrika, dan Asia berdasarkan sifat kimia dari minuman yang dihasilkan dilakukan dalam penelitian oleh Demianová et al. [139]. Pada lima belas sampel kopi hijau (lima dari Amerika, lima dari Asia, dan lima dari Afrika), yang kemudian disangrai hingga tingkat sedang, total antioxidant capacity (TAC) ditentukan secara spektrofotometri menggunakan metode DPPH, dan kandungan CafQA isomer dan kafein yang ditentukan dengan metode HPLC-UV/VIS dinilai. Untuk sampel kopi hijau, nilai TAC dan kafein tertinggi ditemukan pada sampel Amerika, sedangkan kandungan isomer CafQA tertinggi diamati pada sampel Afrika. Untuk sampel kopi sangrai, nilai isomer TAC dan CafQA menurun rata-rata 13,5% dan 90%, masing-masing.

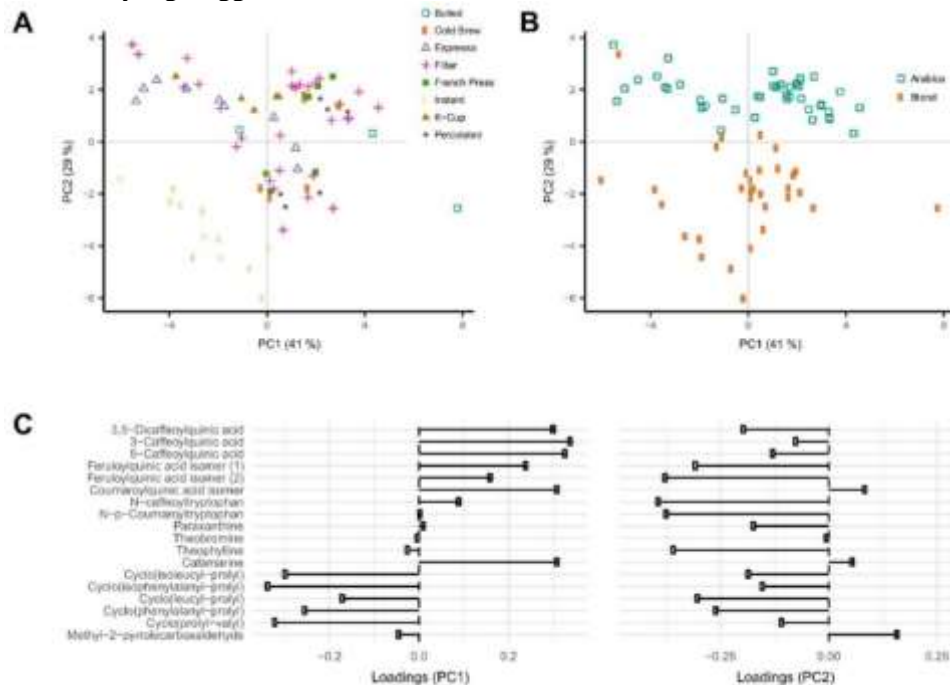


Gambar 5. Pemisahan HPLC dari asam klorogenat (1), kafein (2), asam caffeic (3), asam coumaric (4), dan asam ferulic (5) hadir dalam kopi hijau bubuk, suplemen makanan, dan ekstrak kopi hijau [146]. Menggunakan HPLC, Cheserek et al. [137] mencirikan kafein, asam klorogenat, dan senyawa biokimia lainnya dalam dua puluh sampel biji kopi hijau dari Kenya, termasuk genotipe berbeda dari Arabika, Robusta, dan berbagai persilangan hibridanya (Arabusta). Hasilnya diproses oleh PCA, dan korelasi asam klorogenat dengan kafein dicatat. Robusta mengandung kadar kafein dan asam klorogenat yang lebih tinggi dibandingkan dengan hibrida Arabusta, yang komposisinya lebih mirip dengan Arabika. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Arabusta hibrid mengungguli kopi Robusta dalam hal kandungan dan representasi senyawa biokimia, yang berarti keberhasilan intrograsi gen kualitas.

Pekerjaan serupa dilakukan oleh Gutiérrez Ortiz et al. [143], yang secara kromatografi menentukan ketiga isomer pCoQA dan jumlah asam klorogenat (CafQA, diCafQA, FQA, dan isomer pCoQA) dalam 14 sampel *C. arabica*, *C. canephora*, dan *C. liberica* yang tersedia secara komersial, dan 13 sampel liar spesies dari genus *Coffea* (semua sampel memiliki asal geografis berbeda yang berasal dari Honduras, Ceylon, Guyana Prancis, Afrika Timur, Prancis, Mozambik, Portugal, Brasil, Kolombia, Ethiopia, India, Yaman, Vietnam, dan Guatemala). Ini adalah pertama kalinya distribusi semua isomer pCoQA dalam sampel kopi tipe liar dijelaskan. Kandungan pCoQA tertinggi dan terendah masing-masing terdapat pada *C. sessiliflora* (2,18 mg/g) dan *C. pseudozanguebariae* (0,12 mg/g) di alam liar. Kandungan rata-rata pCoQA dalam biji

kopi hijau komersial adalah 0,55 mg/g. Selanjutnya, pengaruh proses pemanggangan dan asal geografis spesies komersial pada distribusi isomer pCoQA, dievaluasi.

Instrumentasi HPLC-MS digunakan dalam pendekatan metabolomik yang menganalisis 76 sampel seduhan kopi yang diperoleh dengan metode penyeduhan berbeda, tingkat penyangraian, spesies biji, dan jenis kopi [149]. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi karakteristik kopi yang paling mempengaruhi profil kimianya. Analisis statistik PCA (Gambar 6) membagi sampel menurut metode penyeduhan (kopi instan, espresso, dan minuman kopi K-cup). Diskriminasi yang jelas antara sampel Arabika 100% dan campuran Arabika/Robusta juga diamati pada sebar yang sama (Gambar 6). Konsentrasi tinggi dari enam ester asam fenolik bersama dengan cafamarine dan, secara bersamaan, konsentrasi rendah dari lima diketopiperazine adalah deskriptor utama PC1, sedangkan PC2 dijelaskan oleh dua isomer asam feruloylquinic, dua amida asam fenolik, dan lima diketopiperazine. Perbedaan antara seduhan kopi biasa dan tanpa kafein dicapai sepanjang PC3, yang dijelaskan oleh kandungan paraxanthine dan theobromine yang tinggi.



Gambar 6. Diskriminasi dari 76 sampel kopi menggunakan analisis komponen utama: skor PCA dari brews kopi yang berbeda (A) dan varietas biji kopi yang berbeda (B) dan plot pemuatan PCA yang sesuai (C) [149].

Kandungan kafein, trigonelin, N-metilpiridinium, niasin, dan asam klorogenat yang terdapat dalam 65 kapsul Italia sampel kopi berkafein, serta tanpa kafein, diperiksa menggunakan HPLC yang digabungkan dengan spektrometri massa tandem (HPLC-MS/MS). PCA menunjukkan variabilitas yang luas baik di antara kapsul merek yang sama maupun di antara merek yang berbeda, yang berarti bahwa kandungan senyawa bioaktif dalam secangkir kopi dapat bervariasi secara signifikan [140].

Karena ekstrak biji kopi hijau tanpa kafein memiliki efek menguntungkan dan dijual sebagai nutraceuticals atau sebagai suplemen makanan, HPLC-MS digunakan untuk mengidentifikasi dan mengukur PP dalam kopi hijau, panggang, dan bekas, serta dalam kulit perak kopi untuk perbandingan selanjutnya. tingkat dalam produk ini [40]. Ekstrak Silverskin memiliki profil PPs yang tumpang tindih dibandingkan dengan ekstrak

biji kopi hijau. Selain itu, profil ini tidak berubah bahkan setelah dekafeinasi kulit perak. Karena kafein tidak selalu cocok dengan tujuan nutraceutical dari ekstrak yang mengandung CGA, kulit perak tanpa kafein dapat dianggap sebagai bahan baku yang lebih baik untuk menghasilkan ekstrak CGA daripada biji kopi hijau yang lebih mahal. Temuan ini juga berkontribusi pada dampak industri kopi yang lebih berkelanjutan.

Pengaruh derajat pemanggangan yang berbeda (hijau/belum dipanggang, terang, sedang, dan gelap) pada komposisi fitokimia biji Arabika diselidiki oleh Montenegro et al. [138]. Diketahui bahwa proses pemanggangan mempengaruhi kandungan fitokimia, dan dapat terbentuk senyawa yang tidak diinginkan. Dengan demikian, jumlah kafein, asam klorogenat, dan trigonelin yang ada dalam biji kopi yang disangrai dengan berbagai derajat dianalisis menggunakan HPLC-UV/VIS. Selanjutnya, metode DPPH, ABTS, FRAP, dan ORAC yang digunakan untuk menentukan kapasitas antioksidan ekstrak, serta kandungan fenolik total, dinilai. Selanjutnya, dugaan efek pencegahan dari konsumsi kopi terhadap perkembangan kanker prostat dievaluasi.

Analit target diisolasi dari sampel dengan ekstraksi gelombang mikro, yang merupakan alternatif dari teknik ekstraksi konvensional karena mempertahankan lebih banyak senyawa bioaktif karena suhu yang lebih rendah dan waktu yang lebih singkat. Ekstrak sampel kopi sangrai hijau dan ringan menunjukkan kapasitas antioksidan tertinggi, dan dengan demikian, dibandingkan dengan ekstrak kopi sangrai sedang dan gelap, mendorong penghambatan viabilitas sel yang lebih tinggi, menyebabkan penghentian siklus sel yang lebih besar, dan lebih banyak menginduksi apoptosis. Kandungan kafein tidak terpengaruh oleh pemanggangan, sedangkan asam klorogenat terdegradasi karena suhu tinggi, sehingga jumlahnya lebih rendah pada biji sangrai sedang dan gelap. Studi ini menunjukkan bahwa konsumsi ekstrak kopi sangrai hijau dan ringan berkontribusi pada penghambatan perkembangan tumor prostat.

Penentuan sifat fisika-kimia terpilih dari seduhan kopi yang disiapkan dengan dua metode berbeda (metode filtrasi dan moka) dari biji Kopi Arabika yang sama yang disangrai hingga tingkat gelap sedang diselidiki oleh Bobková et al. [11]. Mereka berfokus pada analisis bahan kering, pH, dan kandungan asam klorogenat dan kafein, dan data yang diperoleh dievaluasi dengan PCA dan ANOVA. Kandungan kafein dalam cangkir sangat tergantung pada metode penyiapan, termasuk jenis kontak antara bubuk kopi dan pelarut, derajat pemanggangan, waktu ekstraksi, rasio kopi/air, suhu, tekanan uap/proses perebusan, dan kinetika kafein. [150]. Dalam hal kandungan kafein, analisis ANOVA mengungkapkan perbedaan yang signifikan antara dua prosedur persiapan (ditemukan konsentrasi antara 1,37-1,78%), dengan sampel yang disiapkan dengan metode filtrasi memiliki kandungan kafein yang lebih rendah. Konsentrasi CGA dalam kopi yang disaring dan kopi moka yang ditentukan menggunakan HPLC-UV/VIS masing-masing berkisar antara 1,41–2,94 g/100 g dan 1,49–3,36 g/100 g. ANOVA menemukan bahwa perbedaan ini secara statistik tidak signifikan dan, oleh karena itu, konten CGA hampir tidak bergantung pada metode persiapan. Kesimpulan ini selanjutnya dikonfirmasi oleh analisis PCA [11].

Pengaruh proses pemanggangan kopi pada senyawa terpilih diselidiki oleh Macheiner et al. [144] dan Schouten dkk. [141] masing-masing menggunakan instrumentasi HPLC-UV/VIS dan HPLC-MS/MS. Macheiner et al. [144] meneliti perubahan isomer CafQA dan diCafQA yang ada dalam sampel kopi Arabika dan Robusta selama berbagai derajat dan suhu pemanggangan, ukuran batch, dan desain pemanggang, sementara Schouten et al. [141] berfokus pada perubahan kapasitas antioksidan (metode FRAP, DPPH, dan ABTS), kandungan fenolik total (metode Folin-Ciocalteu), penurunan berat badan, aktivitas air, kepadatan, kelembaban, dan warna, serta perubahan konsentrasi akrilamida, trigonellin, dan asam nikotinat dan caffeic dalam sampel kopi Arabika dan Robusta disangrai hingga lima derajat pemanggangan yang

berbeda (terang, sedang-terang, sedang, sedang-gelap, dan gelap). Terlepas dari asal botani sampel, kapasitas antioksidan paling tinggi pada dua tahap pertama pemanggangan kopi.

Dengan tingkat pemanggangan yang lebih tinggi, kapasitas antioksidan menurun, tetapi karena pembentukan molekul antioksidan lain, seperti asam kuinat bebas, melanoidin, atau senyawa fenolik dengan berat molekul rendah lainnya, penurunannya hanya sedang [141]. Temuan analog mengenai isomerisasi dan perubahan komposisi lainnya yang terjadi selama proses pemanggangan juga dilaporkan dalam penelitian oleh Klikarová et al. [88]. Selanjutnya, Schouten et al. [141] menyatakan bahwa total konten CGA lebih tinggi pada sampel sangrai hijau dan ringan. CGA yang paling banyak adalah 5-CafQA (sekitar 80%), diikuti oleh 3-CafQA dan 3,5-diCafQA. Kandungan 3-CafQA meningkat dengan pemanggangan ringan, sedangkan 5-CafQA berkurang atau stagnan. Penurunan 5-CafQA, 3-CafQA, dan 3,5-diCafQA masing-masing sekitar 90%, 70%, dan 70%, diamati pada sampel panggang gelap.

Tidak ada perbedaan signifikan dalam kapasitas antioksidan yang ditemukan antara sampel hijau Robusta dan Arabika. Namun, setelah disangrai, sampel Robusta menunjukkan nilai yang jauh lebih tinggi, mungkin karena kandungan kafein yang lebih tinggi. Sebaliknya, kadar CGA total dan trigonelin lebih tinggi pada sampel Arabika [141]. Menurut Macheiner et al. [144], reaksi isomerisasi asam klorogenat terdeteksi pada tahap yang sebanding dari proses pemanggangan kopi, terlepas dari spesies, varietas, ukuran batch, atau desain pemanggang. Degradasi 3-CafQA dan 4-CafQA akibat reaksi isomerisasi lebih lambat dan terjadi lebih lambat pada biji Robusta dibandingkan pada biji Arabika. Konsentrasi 3,4-diCafQA dan 4,5-diCafQA tetap hampir tidak berubah hingga retakan pertama, sementara 3,5-diCafQA terdegradasi sangat cepat terlepas dari spesies *Coffea*, ukuran batch, dan desain pemanggang. Setelah itu, konsentrasi semua isomer diCafQA yang teramati terus menurun hingga akhir proses pemanggangan.

Penapisan lima asam klorogenat dan kafein dalam biji kopi hijau menggunakan kromatografi cair tekanan rendah (pada kolom monolitik sepanjang 1 cm) dengan deteksi amperometri dilakukan oleh Silva et al. [124]. Metode mereka cepat, murah, mudah digunakan, dan menghasilkan volume limbah yang rendah. Instrumentasi ini telah terbukti sebagai teknik yang efisien dan serbaguna yang mampu melakukan pemrosesan sampel otomatis dengan kecepatan tinggi. Untuk alasan tersebut di atas, dianggap kompetitif untuk metode HPLC konvensional.

Komposisi kimia (senyawa fenolik dan kandungan kafein), sifat fisiko-kimia terpilih, dan aktivitas antioksidan dari 26 sampel kopi konvensional dan 19 organik yang berasal dari daerah produksi utama Brasil dievaluasi menggunakan berbagai alat kemometrik, seperti PCA, analisis diskriminan linier (LDA), regresi kuadrat terkecil parsial yang dikombinasikan dengan analisis diskriminan (PLS-DA), pemodelan analogi kelas lunak independen berbasis data (DD-SIMCA), mesin vektor dukungan (SVM), dan k-nearest neighbor (k-NN) [60]. Sampel kopi organik dan konvensional memiliki sistem budidaya yang berbeda dan berhasil dibedakan menggunakan PCA. Namun, perbedaan mereka di antara wilayah produksi atau asal tumbuhan tidak tercapai dengan metode statistik ini. Di sisi lain, PLS-DA, LDA, SVM, dan k-NN dapat membedakan hampir semua sampel berdasarkan sistem budidaya dan varietas kopi. Parameter yang dipantau tidak bergantung secara signifikan pada asal geografis kopi, sehingga tidak dapat diestimasi.

Analisis Tidak Bertarget

Baru-baru ini, banyak pendekatan analisis non-target telah dikembangkan, tidak hanya berurusan dengan sidik jari HPLC [1,49,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160], tetapi juga, lebih jarang, dengan pembuatan profil menggunakan teknik seperti kromatografi gas digabungkan dengan

spektrometri massa [19,125,161], resonansi magnetik nuklir (NMR) [103,115], spektroskopi UV/VIS [162], atau spektrometri emisi optik plasma yang digabungkan secara induktif [66,70]. Teknik-teknik ini sebagian besar dikombinasikan dengan metode statistik multidimensi, seperti PCA, analisis faktor (FA), analisis diskriminan (DA), regresi kuadrat terkecil parsial (PLS), dan kombinasinya (misalnya, PLS-DA), untuk mendapatkan sebanyak mungkin informasi dari data terukur.

Strategi sidik jari kromatografi non-target didasarkan pada perekaman sinyal instrumental sebagai fungsi waktu retensi, tetapi tanpa mengetahui informasi lebih lanjut (identifikasi atau kuantifikasi) tentang senyawa yang menyediakan sinyal ini. Untuk tujuan ini, prosedur pemrosesan sampel sederhana biasanya digunakan untuk mendapatkan sebanyak mungkin senyawa dari keluarga yang berbeda [151]. Dengan demikian, analisis non-target merupakan metode yang sangat sederhana, cepat, dan murah yang dapat digunakan secara menguntungkan untuk memverifikasi keaslian dan kualitas kopi.

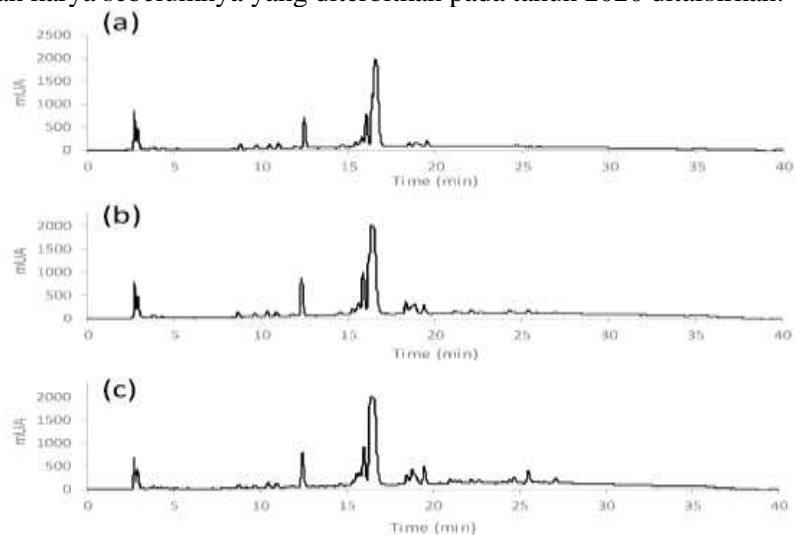
Profil metabolik HPLC-MS non-target secara efektif digunakan untuk menjelaskan hubungan antara metabolit dan skor bekam yang menunjukkan kualitas minuman [152]. Secara total, tiga puluh enam varietas kacang hijau dari Guatemala menjadi sasaran analisis. Dengan menggunakan model regresi ortogonal parsial kuadrat terkecil (OPLS), dua metabolit (dari total 2649 puncak yang valid) ditemukan berkorelasi kuat dengan skor bekam yang tinggi, dan karenanya dapat digunakan sebagai indikator kualitas universal. Metabolit pertama-tama dimurnikan dan kemudian secara spektroskopi diidentifikasi sebagai isomer dari 3-metilbutanoil disakarida (yaitu, prekursor asam 3-metilbutanoat yang diketahui dapat meningkatkan kualitas kopi).

Metodologi serupa disajikan dalam penelitian oleh Sittipod et al. [153], yang menggunakan profil HPLC-MS non-target dari delapan belas sampel kopi, bersama dengan analisis OPLS, untuk menemukan bahan kimia yang meningkatkan kualitas rasa kopi. Terlepas dari kenyataan bahwa empat senyawa berkorelasi positif dengan skor cangkir diisolasi dan dimurnikan, hanya tiga dari mereka yang dikonfirmasi oleh analisis rekombinasi sensorik (dilakukan oleh Q-grader Asosiasi Kopi Spesialisasi bersertifikat) sebagai indikator yang secara signifikan meningkatkan skor cangkir. Selanjutnya, dengan menggunakan NMR dan MS beresolusi tinggi, senyawa ini diidentifikasi sebagai turunan baru dari asam 3-metilbutanoilkuinat. Meskipun tidak satupun dari mereka menunjukkan aktivitas rasa langsung, dapat dikatakan bahwa mereka bertindak sebagai pengubah rasa.

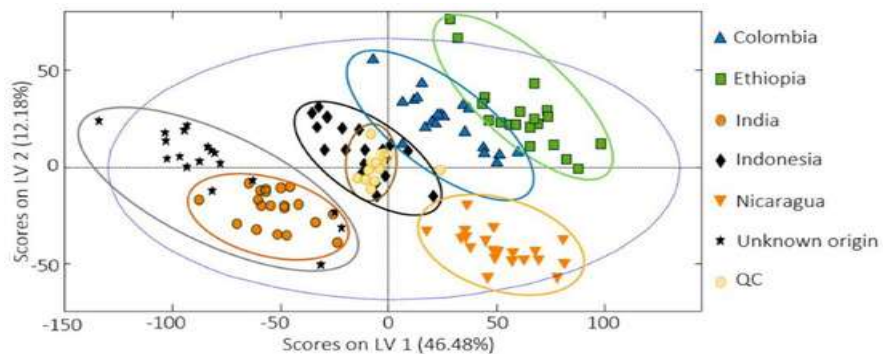
Pendekatan lain untuk analisis metabolomik non-target, berdasarkan analisis ultra HPLC-MS yang dikombinasikan dengan pemrosesan statistik dari data terukur, dipresentasikan oleh Xu et al. [154]. Menggunakan PCA dan analisis clustering hirarkis, semua sampel berhasil dibagi menjadi tiga kelompok sesuai dengan metode pembuatan bir (tuangkan, rebus, dan minuman dingin). Untuk karakterisasi dan evaluasi keaslian dan kualitas kopi, total lima makalah mengenai strategi sidik jari HPLC non-target menggunakan UV/VIS atau deteksi fluoresen (FLD), dikombinasikan dengan kemometrik, diterbitkan oleh para peneliti Spanyol pada tahun 2020–2021 [1.151.155.156.157]. Pada tahun 2020, mereka menganalisis total 306 sampel kopi yang tersedia secara komersial, 240 di antaranya adalah produk jenis Nespresso dari berbagai asal (Nikaragua, Brasil, India, Uganda, Etiopia, Amerika Tengah/Selatan, Kolombia, atau Indonesia), dibeli di supermarket di Barcelona (Spanyol), dan diseduh langsung dengan menggunakan mesin espresso [1]. 66 sampel berikutnya dibeli dalam bentuk kacang di Vietnam dan Kamboja dan, setelah digiling, diseduh menggunakan pembuat kopi moka pot. Semua sampel berbeda dalam varietas (Arabika, Robusta, atau campurannya) dan tingkat pemanggangan (1-5). Sampel yang dipilih juga digunakan untuk studi pemalsuan di mana kopi asli dicampur dengan kopi “adulterant” (Kolombia vs. Ethiopia, Kolombia vs. Nikaragua, India vs. Indonesia, Vietnam-Arabika vs. Vietnam-Robusta, Vietnam-

Arabika vs. Kamboja , dan Vietnam-Robusta vs. Kamboja) dalam berbagai rasio berkisar antara 100:0–0:100 (kopi asli: kopi campuran; b/b). Sidik jari HPLC-UV/VIS (Gambar 7) menjadi sasaran analisis statistik (regresi PCA, PLS-DA, dan PLS) dan ditemukan deskriptor kimia yang cukup untuk mengklasifikasikan kopi berdasarkan asal geografis (bahkan untuk negara terdekat seperti Vietnam dan Kamboja) , varietas, dan derajat pemanggangan (Gambar 8).

Mengenai asal botani (varietas), perbedaannya terutama didasarkan pada intensitas relatif dari sinyal puncak, karena profil sidik jarinya serupa (Gambar 7). Selain itu, regresi PLS dapat mengungkapkan pemalsuan kopi hingga 15% dari pemalsuan kopi (kopi dari asal geografis atau botani yang berbeda dari yang dinyatakan) [1]. Semua 66 sampel Vietnam dan Kamboja, bersama dengan setengah dari sampel tipe Nespresso, keduanya diproses seperti sebelumnya, juga dianalisis dengan HPLC-FLD untuk mendapatkan sidik jari yang juga menjadi sasaran analisis statistik PCA dan PLS-DA [155]. Sidik jari HPLC-FLD dari hanya dua sampel kopi Vietnam, satu Kamboja, dan lima sampel kopi jenis Nespresso digunakan lagi untuk mengungkap kasus pemalsuan yang terkait dengan wilayah produksi yang berbeda. Untuk tujuan ini, pasangan kopi asli dan kopi campuran yang sama (Kolombia vs. Ethiopia, Kolombia vs. Nikaragua, India vs. Indonesia, Vietnam-Arabika vs. Vietnam-Robusta, Vietnam-Arabika vs. Kamboja, dan Vietnam-Robusta vs. . Kamboja) dibandingkan [156]. Dari dua makalah ini, kesimpulan yang identik dengan karya sebelumnya yang diterbitkan pada tahun 2020 ditafsirkan.



Gambar 7. Sidik jari HPLC-UV/VIS kopi Arabika non-target dari Ethiopia (a), campuran Arabika-Robusta dari India (b), dan kopi Robusta dari Uganda (c) [1].

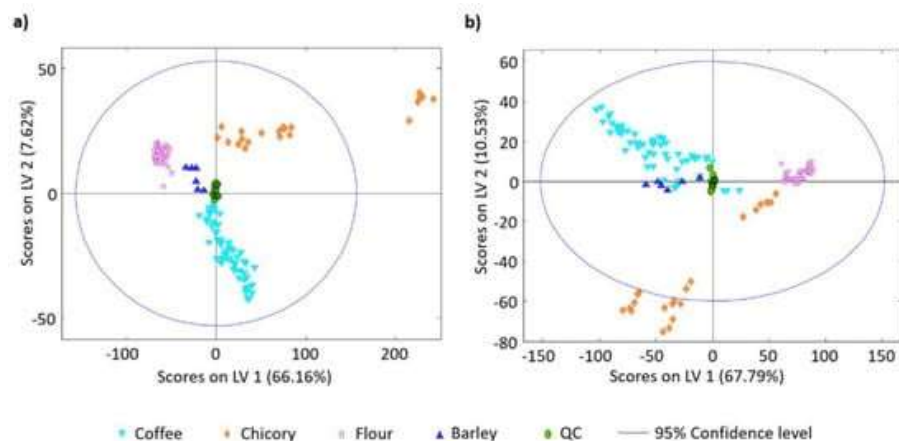


Gambar 8. Diferensiasi PLS-DA sampel kopi berdasarkan asal geografisnya [1].

Selanjutnya, sidik jari HPLC-UV/VIS dan HPLC-FLD dari hanya 54 sampel kopi Vietnam dan Kamboja sebelumnya, bersama dengan 69 sampel sawi putih, tepung (gandum, beras, tepung jagung, gandum hitam, dan oatmeal), dan jelai, yang merupakan kemudian dicampur ke dalam kopi sebagai pemalsuan dalam rasio berkisar antara 100:0-0:100 (kopi:pengotor; b/b), dievaluasi menggunakan PLS-DA untuk menentukan tingkat pemalsuan [151]. Berbagai pelarut ekstraksi (air, metanol, etanol, asetonitril, aseton, dan campuran organik-air yang mengandung 20, 50, dan 80% dari setiap komponen organik yang diperiksa) diuji untuk mendapatkan jumlah sinyal maksimum. Kapasitas ekstraksi tertinggi dicapai dengan menggunakan H₂O:asetonitril (50:50, v/v) dan H₂O:metanol (50:50, v/v) masing-masing untuk deteksi FLD dan UV/VIS.

Pemalsuan kopi memberikan sidik jari yang sama sekali berbeda dari sampel kopi, dan jumlahnya dapat dideteksi hingga 15%. Membandingkan kedua teknik sidik jari (Gambar 9), sidik jari HPLC-FLD tidak sepenuhnya membedakan kopi dari sampel jelai, sementara semua sampel dibedakan dengan sempurna oleh sidik jari HPLC-UV/VIS [151]. Perbandingan penerapan sidik jari HPLC-UV/VIS dan HPLC-FLD untuk deteksi dan kuantifikasi sawi putih yang ada dalam kopi instan reguler (40 sampel) dan kopi tanpa kafein (26 sampel) kembali dilakukan oleh kelompok peneliti Spanyol yang sama [157]. Selain sampel kopi, 22 sampel bubuk dan sawi putih instan dianalisis. Sampel instan dibuat dengan cara dilarutkan dalam air panas, sedangkan sampel bubuk diseduh menggunakan alat pembuat kopi moka pot.

Mengenai analisis statistik, PCA adalah metode eksplorasi yang digunakan untuk mengevaluasi kinerja solusi kendali mutu dan memastikan kekokohan pemrosesan data kemometrik, PLS-DA adalah metode klasifikasi (kopi biasa, kopi tanpa kafein, dan sawi putih), dan PLS disajikan sebagai metode kalibrasi multidimensi untuk kuantifikasi sawi putih dalam kasus penentuan tingkat pemalsuan kopi. Berdasarkan kedua sidik jari HPLC, sampel kemungkinan dibedakan menjadi tiga kelompok sesuai dengan karakteristiknya dan penipuan kopi terdeteksi hingga 15% dari kandungan sawi putih. Meskipun sidik jari HPLC-UV/VIS lebih baik untuk membedakan antara kopi biasa dan kopi tanpa kafein, metode HPLC-FLD memberikan linearitas dan kesalahan kalibrasi yang lebih baik, serta kesalahan prediksi yang lebih rendah.



Gambar 9. Klasifikasi sampel PLS-DA menggunakan sidik jari HPLC-UV/VIS (a) dan HPLC-FLD (b) [151].

Metode sidik jari HPLC sederhana, bersama dengan penentuan senyawa bioaktif terpilih secara simultan, dikembangkan untuk mengevaluasi kualitas dua puluh empat sampel C. arabica dari asal geografis yang berbeda [158]. Sekitar 50 puncak diamati pada sidik jari. Namun, hanya tiga belas puncak intens dengan resolusi yang baik yang mencirikan sampel yang dipilih. Analisis korelasi dan analisis PCA membuktikan bahwa kombinasi

sidik jari HPLC dan analisis kuantitatif dapat menjadi alat yang efektif untuk evaluasi kualitas kopi.

Sekelompok ilmuwan Brasil berfokus pada sidik jari kultivar *C. arabica* L. yang berbeda, yaitu kultivar Bourbon merah tradisional yang dinyatakan sebagai kopi Arabika murni, tanpa pemuliaan atau persilangan dengan kultivar lain, dan hibrida hasil rekayasa genetika IAPAR59, IPR101, dan IPR108 yang telah berasal dengan melintasi [159,160]. Dalam kedua karya, empat pelarut organik (etanol, etil asetat, diklorometana, dan heksana) dan campurannya (total 15 upaya) diuji untuk ekstraksi ultrasonik zat yang ada dalam kultivar ini. Pelarut ekstraksi terbaik dipilih menggunakan desain statistik multivariat, diikuti dengan perlakuan data PCA [159], atau analisis faktor paralel (PARAFAC) [160].

Menurut analisis PCA dari HPLC-UV/VIS dan sidik jari spektroskopi inframerah (diperoleh setelah ekstraksi dengan 15 campuran pelarut), etanol-diklorometana (1:1) adalah ekstrak terbaik untuk membedakan antara kultivar. Penyerapan spektra HPLC-UV/VIS yang direkam pada 275 nm berkorelasi dengan intensitas penyerapan inframerah antara 3400–3460 cm^{-1} , dan dapat dijelaskan dengan perbedaan kadar kafein dalam kultivar yang diuji [159]. Sebaliknya, dalam penelitian Guizzellini [160], efisiensi ekstraksi yang lebih tinggi dicapai dengan menggunakan campuran etanol, diklorometana, dan heksana, dan campuran keempat pelarut masing-masing untuk kultivar Bourbon dan IPR101. Strategi PARAFAC tiga arah menentukan korelasi data kromatografi dan spektral secara bersamaan, memungkinkan penugasan kelompok metabolik yang lebih jelas daripada yang dapat diperoleh dengan perlakuan data HPLC-UV/VIS konvensional.

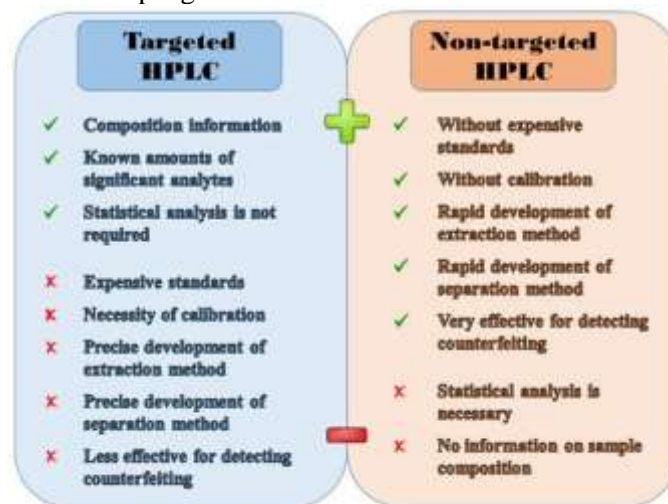
Tidak hanya pengaruh varietas (Arabika atau Robusta), tetapi terutama pengaruh kondisi pemanggangan pada radiasi inframerah-dekat (NIR) dan profil kopi HPLC-UV/VIS, diselidiki dalam studi oleh De Luca et al. [49]. Data diproses menggunakan analisis komponen ANOVA-simultan, yang memungkinkan karakterisasi seluruh profil instrumental, sehingga memberikan karakterisasi holistik dari proses pemanggangan dan otentikasi biji kopi individu. Dengan mengolah data NIR, ditemukan bahwa varietas dan waktu pemanggangan berpengaruh nyata terhadap profil spektral. Selain itu, PLS-DA dan SIMCA diterapkan pada data sidik jari NIR untuk memverifikasi asal tumbuhan biji kopi. PLS-DA menghasilkan sekitar 98% klasifikasi yang benar, dan nilai sensitivitas dan spesifisitas biasanya di atas 90% menggunakan SIMCA. Temuan serupa diperoleh dengan profil kromatografi. Hampir semua analit yang terdeteksi oleh HPLC memiliki konsentrasi yang lebih rendah pada sampel Arabika daripada sampel Robusta. Sedangkan untuk pengaruh waktu penyangraian, intensitas hampir semua puncak mengalami penurunan seiring dengan bertambahnya waktu penyangraian.

KESIMPULAN

Dengan meningkatnya konsumsi kopi setiap tahun, permintaan dan tekanan terhadap kualitasnya yang sangat tinggi juga meningkat. Untuk alasan ini, metodologi yang efektif untuk menganalisis komposisi kimia kopi, dan memverifikasi keaslian dan kualitasnya, masih dicari. Menggabungkan HPLC dengan metode kemometri telah terbukti menjadi alat yang sangat diperlukan dalam penemuan deskriptor yang mampu mendeteksi perbedaan antara sampel mengenai kualitas produk, asal geografis produksi, genotipe, bentuk budidaya (konvensional atau organik), tingkat pemanggangan, metode pembuatan bir, dll. Dalam ikhtisar ini, kami merangkum tren terbaru dalam metode analisis HPLC target dan non-target dari antioksidan kopi paling dominan yang digunakan tidak hanya untuk mengkonfirmasi keaslian kopi, tetapi juga untuk

mengungkapkan bagaimana proses produksi (pemanggangan, penyimpanan, dll), bersama dengan metode penyeduhan kopi, mempengaruhi komposisi minuman yang dihasilkan.

Gambar 10 dengan jelas mengilustrasikan keuntungan dan kerugian utama dari analisis yang ditargetkan dan tidak ditargetkan. Mengenai analisis yang ditargetkan, ini memberikan informasi yang sangat berharga tentang kejadian dan konsentrasi analit terpilih (biasanya signifikan) dalam sampel, bahkan tanpa pemrosesan statistik dari data yang diperoleh. Sayangnya, penentuan kualitatif dan kuantitatif ini tidak dapat dilakukan tanpa perolehan standar analitik yang seringkali mahal dan penerapan metode kuantitatif apa pun yang memerlukan analisis tambahan terkait dengan peningkatan konsumsi bahan kimia. Jika kita mempertimbangkan juga pengembangan metode ekstraksi yang memakan waktu yang cocok untuk analit terpilih (dengan pemulihan tinggi), dan optimalisasi pemisahan HPLC yang lama, yang harus menyediakan puncak yang cukup terpisah dengan resolusi yang baik, analisis yang ditargetkan kemudian mewakili waktu yang relatif, finansial-, dan secara manual menuntut pendekatan multi-langkah. Meskipun kemajuan teknologi telah memungkinkan untuk mendeteksi praktik penipuan dalam kopi dengan menentukan penanda kimia atau biologis tertentu dengan sensitivitas yang lebih tinggi daripada sebelumnya, dapat dikatakan bahwa analisis yang ditargetkan tidak dapat mengungkapkan semua praktik pemalsuan yang umum, dan dengan demikian penerapannya hanya terbatas. di lapangan ini.



Gambar 10. Manfaat dan kerugian utama dari analisis yang ditargetkan dan tidak ditargetkan

Di sisi lain, dalam analisis non-target (sidik jari/pembuatan profil sampel), prosedur tradisional untuk menentukan analit dalam sampel dilewati (Gambar 4) karena tidak penting untuk mengetahui analit mana yang terkandung dalam sampel, apalagi berapa jumlahnya. Ini menunjukkan bahwa kita tidak memerlukan standar analitik untuk mengidentifikasi puncak yang diberikan, atau untuk kuantifikasi selanjutnya dengan beberapa metode kuantitatif (misalnya, metode kurva kalibrasi, metode penambahan standar berganda, metode perbandingan langsung, dll.). Dalam analisis tidak bertarget, bahkan optimalisasi ekstraksi dan pemisahan berbeda dari yang digunakan dalam analisis bertarget standar. Dalam hal ini, tujuannya hanyalah untuk mendapatkan puncak sebanyak mungkin dan dengan demikian kromatogram yang paling kaya. Berkat pengoptimalan pra-perawatan dan pemisahan sampel yang mudah dan cepat, tidak ada persiapan larutan kalibrasi, dan tidak ada identifikasi dan kuantifikasi puncak, kami secara signifikan mengurangi biaya dan waktu akhir. Hasilnya, lebih sedikit tuntutan yang dibebankan pada operator, yang juga mengurangi tingkat kesalahan. Seluruh proses analisis non-target diperumit hanya dengan langkah akhir (namun wajib) dari pengolahan

data statistik. Hanya menggunakan metode statistik multivariat mengarah pada pengungkapan sampel yang dapat diandalkan yang dipalsukan oleh berbagai praktik yang diketahui. Kesimpulannya, kita dapat meringkas bahwa studi yang berhubungan dengan analisis non-target dapat memperoleh sejumlah besar informasi (tanpa memerlukan analisis kualitatif dan kuantitatif tertentu), membuat keseluruhan analisis jauh lebih cepat dan lebih informatif, akurat, efisien, dan terutama lebih cocok untuk penilaian kualitas sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Núñez, N.; Collado, X.; Martínez, C.; Saurina, J.; Núñez, O. Authentication of the origin, variety and roasting degree of coffee samples by non-targeted HPLC-UV fingerprinting and chemometrics. Application to the detection and quantitation of adulterated coffee samples. *Foods* 2020, 9, 378. [Google Scholar] [CrossRef]
- International Coffee Organization (ICO). Total Production by All Exporting Countries. Available online: <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf> (accessed on 20 June 2022).