

# Pengaruh Antioksidan dan Kombinasi Pengawet terhadap Stabilitas Ekstrak Cair NADES Biji Kopi Hijau

Delly Ramadan<sup>1</sup>, Rosalina Mesusi Septiani<sup>2</sup>, Salsabila Nursyifa Putri<sup>2</sup>, Abdul Mun'im<sup>2\*</sup>

## Artikel Penelitian

**Abstract:** Green coffee beans (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) contain caffeine and chlorogenic acid which are beneficial for health. These two main ingredients can be extracted using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) in combination with the Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) method which is environmentally friendly. NADES can be used for extracting green coffee beans, but the solvent cannot be evaporated, thus the result is a liquid extract. During storage, liquid extracts are susceptible to oxidation and bacterial growth so that they can disrupt physical, chemical, and microbiological stabilities. In this study, butylated hydroxytoluene (BHT) was added as a synthetic antioxidant and a combination of methylparaben-propylparaben as preservative to determine its effect on the physical, chemical, and microbiological stability of the NADES liquid extract of green coffee beans, as well as to determine the best storage temperature. The concentrations of BHT added in this study were 10, 20, and 30 ppm. The concentration of the methylparaben:propylparaben combination added was 110:55 ppm, 100:50 ppm, and 90:45 ppm. Each extract was stored at storage temperatures of  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , and  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  for 54 days. The results showed that the liquid extract added with 30 ppm BHT concentration and a combination of preservatives with a concentration of 110:55 ppm and stored at a storage with the temperature of  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  which had the best physical, chemical, and microbiological stability. This shows that the addition of BHT and a combination of preservatives can increase the stability of the green coffee bean NADES extract.

**Keywords:** green coffee beans, BHT, methylparaben, NADES, propylparaben, stability

<sup>1</sup>Laboratorium Farmasetika dan Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Kampus UI Depok, 16424, Jawa Barat

<sup>2</sup>Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Kampus UI Depok, 16424, Jawa Barat

### Korespondensi:

Abdul Mun'im  
munim@farmasi.ui.ac.id

**Abstrak:** Biji kopi hijau (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) mengandung senyawa kafein dan asam klorogenat yang bermanfaat bagi kesehatan. Dua kandungan utama tersebut dapat diekstraksi menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES) yang dikombinasi dengan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) yang bersifat ramah lingkungan. NADES dapat digunakan untuk mengekstraksi biji kopi hijau, namun pelarutnya tidak dapat diuapkan sehingga hasil akhir yang didapatkan berupa ekstrak cair. Ekstrak cair selama penyimpanan rentan mengalami oksidasi dan pertumbuhan bakteri sehingga dapat mengganggu stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi. Pada penelitian ini, dilakukan penambahan butil hidroksi toluen (BHT) sebagai antioksidan sintetik dan kombinasi metil paraben-propil paraben sebagai pengawet untuk mengetahui pengaruhnya terhadap stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi ekstrak cair NADES biji kopi hijau, serta untuk mengetahui suhu penyimpanan yang paling optimal. Konsentrasi BHT yang ditambahkan pada penelitian ini adalah 10, 20, dan 30 ppm. Konsentrasi kombinasi metil paraben:propil paraben yang ditambahkan adalah 110:55 ppm, 100:50 ppm, dan 90:45 ppm. Masing-masing ekstrak disimpan pada suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , dan  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 54 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak cair yang ditambahkan BHT konsentrasi 30 ppm dan kombinasi pengawet konsentrasi 110:55 ppm serta disimpan pada suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  memiliki stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi paling optimal. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan BHT dan kombinasi pengawet dapat meningkatkan stabilitas ekstrak NADES biji kopi hijau.

**Kata kunci:** biji kopi hijau, BHT, metil paraben, NADES, propil paraben, stabilitas.

## Pendahuluan

Dua jenis kopi yang memiliki tingkat produksi tinggi adalah kopi arabika dan kopi robusta. Pada biji kopi hijau terdapat dua senyawa utama, yaitu asam klorogenat dan kafein. Kopi robusta mengandung senyawa asam klorogenat dan kafein lebih tinggi dibandingkan kopi arabika. Senyawa kafein dalam kopi hijau berfungsi menstimulasi sistem saraf pusat (1,2). Konsumsi kafein umumnya dikaitkan dengan peningkatan kewaspadaan, kinerja fisik, kapasitas belajar, dan membuat suasana hati yang lebih baik (1). Kemudian terdapat penelitian lain yang juga menunjukkan adanya efek antioksidan, antimikroba, dan antihiperlipidemik pada senyawa kafein (3). Asam klorogenat merupakan salah satu polifenol yang paling banyak terkandung dalam biji kopi hijau yang memiliki aktivitas pada antioksidan, antidiabetes, pengelolaan obesitas, dan antihipertensi (2).

Penggunaan NADES telah terbukti dalam ekstraksi senyawa fenolik dan alkaloid (4,5). Ekstrak yang diperoleh bersifat aman untuk diaplikasikan dalam bidang farmasi, kosmetik, dan industri makanan karena menggunakan pelarut yang merupakan eksipien dalam sediaan farmasi. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yuniarti dkk pada tahun 2019 telah berhasil mengoptimasi metode ekstraksi senyawa bioaktif dari biji kopi hijau (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) menggunakan pelarut NADES yang terdiri dari campuran kolin klorida dan sorbitol dengan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE). NADES merupakan pelarut yang sulit untuk diuapkan, namun salah satu keuntungan dari pelarut NADES adalah sifatnya yang aman untuk dikonsumsi sehingga ekstrak cair yang dihasilkan tidak memerlukan penguapan pelarut (6).

Namun demikian, ekstrak cair rentan terhadap pertumbuhan mikroba seperti bakteri, terutama apabila terdapat kandungan air di dalamnya (7). Pertumbuhan bakteri dapat mengganggu stabilitas ekstrak dan memengaruhi kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak tersebut (8,9). Konstituen yang terkandung dalam tanaman dapat dimetabolisme oleh bakteri sehingga menyebabkan terjadinya degradasi terhadap konstituen yang terkandung dalam tanaman tersebut (10). Selain itu, mikroba dapat

mengubah karakteristik fisikokimia berupa warna, bau, dan pH dari suatu ekstrak yang menyebabkan terjadinya perubahan yang merugikan pada kualitas ekstrak (10). Selain itu, antioksidan alami yang terkandung dalam ekstrak, yaitu asam klorogenat cukup rentan terhadap oksidasi dan degradasi selama penyimpanan karena senyawa tersebut memiliki sensitivitas tinggi terhadap kondisi lingkungan (11). Oleh karena itu, laju oksidasi dan degradasi harus diminimalkan untuk meningkatkan stabilitas dan menghindari kehilangan kandungan zat aktif serta aktivitas farmakologisnya. Ekstrak cair yang stabil diperlukan untuk hasil analisis yang tepat sebab ekstrak cair rentan terhadap oksidasi yang dipicu oleh adanya udara, panas, dan cahaya (11,12). Reaksi oksidasi akan menghasilkan radikal bebas yang dapat mengoksidasi zat aktif, mempengaruhi rasa, bau, warna, dan mengurangi *shelf-life* (umur simpan) (12,13,14).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk menjaga stabilitas ekstrak yang berhubungan dengan adanya pertumbuhan mikroba adalah dengan menambahkan pengawet (10). Pengawet yang ditambahkan adalah kombinasi metil paraben dan propil paraben. Kombinasi keduanya dapat memberikan efek antimikroba yang lebih baik (13). Metil paraben dan propil paraben banyak digunakan karena toksisitasnya yang rendah, memiliki aktivitas spektrum yang luas, harganya terjangkau, serta memiliki stabilitas kimiawi yang sangat baik (15). Kemudian, untuk oksidasi dapat dihambat dengan menggunakan antioksidan. Secara bersamaan, perlindungan dari suhu, udara, dan cahaya (13,14). BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) merupakan antioksidan sintetik yang dapat mempertahankan kualitas bahan secara keseluruhan dengan melindungi zat aktif, memperlambat kerusakan, ketengikan, dan perubahan warna yang disebabkan oksidasi (13). Pada penelitian yang dilakukan Obzansky (1989) dan Türkyilmaz (2015) telah menggunakan BHT sebagai antioksidan sintetik dalam larutan dan efektif pada konsentrasi rendah sehingga ideal digunakan sebagai antioksidan pada larutan. Salah satu studi menunjukkan bahwa BHT dalam ekstrak daun *Mesembryanthemum crystallinum* memiliki aktivitas sebagai antioksidan (16). BHT telah umum digunakan di berbagai bidang

industri, seperti farmasi, makanan, dan kosmetik (17). BHT juga umum digunakan karena memiliki efektivitas yang tinggi, ketersediaannya yang luas, dan harganya yang tidak mahal (13).

Uji stabilitas secara umum bertujuan untuk membuktikan mengenai kualitas zat aktif atau produk jadi yang disimpan di bawah pengaruh berbagai faktor lingkungan seperti suhu, kelembaban, dan cahaya dalam rentang waktu tertentu serta untuk menentukan umur simpan dari produk jadi dan memberikan rekomendasi kondisi penyimpanan yang paling baik. Uji stabilitas produk obat herbal mengacu pada pedoman pengujian stabilitas zat aktif yang telah ada dan produk jadi (18). Namun, terdapat beberapa pengecualian untuk uji stabilitas obat herbal, seperti pengujian pada kondisi penyimpanan dipercepat atau pada kondisi penyimpanan *intermediate* dapat diabaikan untuk *herbal substances* atau *herbal preparations*, jika kondisi penyimpanan di bawah 25°C dapat diberi label dengan jelas. Stress testing biasanya dianggap tidak perlu untuk *herbal substances* atau *herbal preparations* kecuali jika menurut penilaian toksikologi perlu dilakukan (19). Pada pengujian stabilitas dari obat herbal, frekuensi pengujian dapat dikurangi dan disesuaikan (18).

Oleh karena itu, BHT sebagai antioksidan sintetik perlu ditambahkan ke dalam ekstrak cair untuk meningkatkan stabilitas fisik dan kimia dari ekstrak cair NADES biji kopi hijau. Selain itu, dilakukan juga percobaan lain berupa penambahan kombinasi metil paraben dan propil paraben sebagai pengawet untuk meningkatkan stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi dari ekstrak cair NADES biji kopi hijau. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan BHT sebagai antioksidan sintetik terhadap stabilitas kimia dan fisik ekstrak cair NADES biji kopi hijau serta pengaruh penambahan kombinasi metil paraben dan propil paraben sebagai pengawet terhadap stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi ekstrak cair NADES biji kopi hijau pada suhu penyimpanan tertentu.

## Bahan dan Metode

### Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah biji kopi hijau robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) yang diperoleh dari

kabupaten Lampung Barat, standar asam klorogenat (*Chengdu Biopurify Phytochemicals*), standar kafein (*Chengdu Biopurify Phytochemicals*), kolin klorida (Rongsheng-Biotech. Xi'an, China), D-Sorbitol (Neosorb P 60 W, PT. Barentsz), asetonitril HPLC grade (Merck, Jerman), metanol HPLC grade (Merck, Jerman), asam asetat (Merck, Jerman), etanol *food grade* 96% (Brataco, Indonesia), *Butylated Hydroxytoluene* (BHT) (Subur Kimia Jaya, Indonesia), metil paraben (Brataco, Indonesia), propil paraben (Brataco, Indonesia), aqua pro injeksi (PT. Ikapharmindi Putramas, Indonesia), dan aquades (Brataco, Indonesia), dan larutan NaCl 0,9% (PT Widatra Bhakti, Indonesia).

### Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan antara lain, *Ultrasound-assisted Extraction* (UAE) (Krisbow, China), alat sentrifugasi, KCKT (Agilent 1200 Infinity High Performance Autosampler) yang dilengkapi dengan kolom C-18 Inertsil ODS 3,5 mm (4,6 mm x 150 mm; GI Sciences, Tokyo, Japan), detektor UV-Vis (Agilent 1200 Infinity High Performance Autosampler), kertas saring millipore 0,45 mm (Merck, Jerman), Pipet mikro (Socorex, Swiss), timbangan mikro (Mettler Toledo), 3M *petrifilm aerobic count plate* (Sigma Aldrich), pH meter (Hanna HI 8424), kulkas, *freezer*, *blender* (Miyako), *hotplate* dan *magnetic stirrer* (IKA® C-MAG HS7).

### Metode

#### Penyiapan Bahan Uji

Simplisia biji kopi hijau diserbukkan menggunakan *blender* dan disaring menggunakan penyaring ukuran 40/80 mesh. Hasil serbuk kopi yang telah didapatkan kemudian disimpan pada suhu ruangan di dalam botol tertutup rapat (20, 21).

#### Ekstraksi Biji Kopi Hijau

Sebanyak 1 g serbuk biji kopi hijau ditimbang kemudian dilarutkan dalam 30 mL larutan NADES. Larutan tersebut kemudian diekstraksi menggunakan UAE selama 60 menit Hasil ekstraksi disentrifugasi dengan kecepatan putar sebesar 4500 rpm selama 17 menit (21).

#### Rancangan Variasi Konsentrasi dan Suhu Penyimpanan

Pada penelitian ini terdiri dari dua percobaan. Percobaan pertama, yaitu ekstrak cair NADES biji kopi hijau yang ditambahkan BHT dengan konsentrasi 10, 20, dan 30 ppm yang secara berturut-turut merupakan ekstrak A, B, C, dan ekstrak tanpa penambahan BHT, yaitu ekstrak D. Kemudian, percobaan kedua, yaitu ekstrak cair NADES biji kopi hijau yang ditambahkan kombinasi metil paraben:propil paraben dengan konsentrasi 110:55 ppm, 100:50 ppm, dan 90:45 ppm yang secara berturut-turut merupakan ekstrak W, X, Y, dan ekstrak tanpa penambahan pengawet, yaitu ekstrak Z. Masing-masing ekstrak disimpan pada vial kaca tertutup rapat pada suhu  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (kondisi umum),  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (*refrigerator*) dan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  (*freezer*) (18). Kemudian masing-masing ekstrak diuji stabilitasnya selama 54 hari pada hari ke-0, 4, 8, 18, 36, dan 54 (22).

#### Uji Stabilitas Fisik

Pengujian stabilitas fisik dilakukan dengan mengamati bau, warna, homogenitas, dan pengukuran pH dari masing-masing ekstrak (23). Pengujian warna dicocokkan dengan *Pantone color chart* (24). Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH meter (23).

#### Uji Stabilitas Kimia

Pengujian stabilitas kimia dilakukan dengan melihat kadar asam klorogenat dan kafein dari masing-masing ekstrak. Analisis kuantitatif asam klorogenat dan kafein dilakukan dengan cara larutan sampel dipipet sebanyak 0,4 mL kemudian dilarutkan dengan aqua bidestilata hingga 10 mL. Campuran tersebut dikocok hingga homogen dan difiltrasi menggunakan membran mikropori 0,45  $\mu\text{m}$ . Setelah itu, diambil 20  $\mu\text{L}$  dan diinjeksikan ke kolom KCKT dengan fase gerak

gradien yang ditunjukkan pada **Tabel 1**. Asam klorogenat diukur pada panjang gelombang 326 nm dan kafein diukur pada panjang gelombang 272 nm (21).

#### Uji Stabilitas Mikrobiologi

Pengujian stabilitas mikrobiologi dilakukan dengan metode uji angka lempeng total (23). Uji ALT dilakukan dengan cara melakukan pengenceran sampel ke dalam 9 mL larutan NaCl 0,9% dalam tabung reaksi sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-1}$ . Dari pengenceran  $10^{-1}$  dipipet 1 mL ke dalam larutan NaCl 0,9% sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-2}$  kemudian dari pengenceran  $10^{-2}$  dipipet 1 mL ke dalam larutan NaCl 0,9% sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-3}$ . Dari setiap pengenceran dipipet 1 mL ke dalam 3M *petrifilm aerobic count plates* dan dibuat duplo kemudian diratakan dengan menggunakan *spreader* agar suspensi tersebar merata. Petrifilm diinkubasi pada suhu  $35-37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam kemudian jumlah koloni yang tumbuh pada petrifilm dihitung. Uji stabilitas mikrobiologi hanya dilakukan pada ekstrak W, X, Y, dan Z.

#### Validasi Metode Analisis

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan cara menginjeksikan larutan standar kafein dan asam klorogenat konsentrasi 20 ppm sebanyak 6 kali pengulangan. Lalu parameter yang dilihat adalah jumlah plat teoritis, *tailing factor*, dan %RSD waktu retensi dari kromatogram standar kafein dan asam klorogenat yang didapat (25, 26). Uji linearitas dilakukan dengan dengan cara menginjeksikan larutan standar kafein dan asam klorogenat konsentrasi 10-50 ppm (20). Lalu dibuat kurva kalibrasi sehingga didapatkan persamaan regresi linear  $y = a + bx$  dan nilai  $r$  (koefisien korelasi) (20, 27).

**Tabel 1.** Komposisi fase gerak dan waktu yang digunakan.

Lama Waktu (menit)	Pelarut Gradien	
	0,1% asam asetat (pelarut X)	Asetonitril (pelarut Y)
20	90%	10%
10	80%	20%
5	90%	10%

Uji presisi dan akurasi dilakukan secara *inter-day* dan *intra-day*. Persisi dinyatakan sebagai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (%KV) (28). Akurasi dapat dilihat berdasarkan hasil uji perolehan kembali (%UPK). Uji akurasi dilakukan dengan metode adisi (29). Preparasi sampel tanpa spike dilakukan dengan cara 0,5 g serbuk biji kopi hijau ditimbang, kemudian diekstraksi menggunakan NADES kolin klorida-sorbitol (4:1) selama 10 menit menggunakan UAE dengan perbandingan pelarut sampel 30:1 mL/g (21). Pembuatan sampel spike dilakukan dengan penambahan masing-masing 3 konsentrasi larutan standar kafein dan asam klorogenat, yaitu 50, 25, dan 12,5 ppm ke dalam ekstrak cair NADES biji kopi hijau dan masing-masing konsentrasi dianalisis sebanyak 3 kali pengulangan (26, 27). Kemudian pada masing-masing larutan sampel dipipet sebanyak 0,4 mL dan dilarutkan dalam aquades bidestilata hingga batas labu ukur 10,0 mL. Lalu disaring menggunakan membran mikropori 0,45  $\mu\text{m}$  dan dianalisis kadar kafein dan asam klorogenat (21).

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dapat dihitung secara statistik dengan garis regresi linear kurva kalibrasi (28).

## Hasil dan Diskusi

Penelitian ini menggunakan bahan uji berupa biji kopi hijau (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) yang dibeli dari kabupaten Lampung Barat, hal ini dikarenakan kopi robusta mengandung senyawa kafein dan asam klorogenat yang lebih tinggi dibandingkan jenis kopi arabika (1, 30). Pada penelitian ini menggunakan biji kopi hijau yang diperoleh tanpa melalui proses pemanggangan (2). Penggunaan biji kopi hijau bertujuan agar kandungan asam klorogenat yang bersifat termolabil dapat terjaga. Sedangkan kafein bersifat termostabil membuat senyawa ini tidak rusak akibat pemanggangan biji kopi (2, 31). Oleh karena itu, dengan menggunakan biji kopi hijau, kedua kandungan tersebut dapat diperoleh secara optimal.

Penyiapan bahan uji dalam penelitian ini dilakukan dengan cara, menyerbukan simplisia biji kopi hijau robusta menggunakan *blender* agar mendapatkan serbuk halus biji kopi hijau robusta. Pengcilan ukuran simplisia sebelum proses

ekstraksi bertujuan agar dapat memaksimalkan proses transfer senyawa yang terkandung dalam tanaman ke pelarut yang digunakan (32). Kemudian, biji kopi yang telah diserbukkan disimpan dalam wadah tertutup rapat.

Proses ekstraksi biji kopi hijau robusta dengan NADES sebagai pelarut menggunakan metode UAE telah dioptimasi sebelumnya oleh Yuniarti *et al.*, (2019). Pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi biji kopi hijau robusta dalam penelitian ini adalah NADES berbasis kolin klorida dan sorbitol dengan perbandingan molar 4:1. NADES merupakan suatu pelarut yang terdiri dari campuran *hydrogen bond acceptor* (HBA) dan *hydrogen bond donor* (HBD) dengan perbandingan molar tertentu yang mampu berinteraksi melalui ikatan hidrogen sehingga dapat membentuk campuran eutektik dengan titik lebur lebih rendah dari masing-masing komponen penyusunnya sehingga hasil akhir yang didapatkan berupa cairan jernih (6, 33, 34). Penambahan air pada proses pembuatan NADES bertujuan untuk mengurangi viskositas dari NADES karena pada viskositas yang tinggi dapat mengurangi efisiensi pada proses ekstraksi (6). Namun, harus diperhatikan penambahan air agar tidak melebihi batas 50% (v/v) karena pengenceran air yang berlebihan dapat mengganggu ikatan hidrogen dalam NADES dan melemahkan interaksi antara NADES dengan senyawa bioaktif yang diinginkan (6, 35).

Penggunaan NADES sebagai pelarut untuk mengekstraksi senyawa bioaktif yang terdapat dalam biji kopi hijau dikombinasikan dengan penggunaan *ultrasound assisted extraction* (UAE). Penggunaan UAE dalam proses ekstraksi bertujuan untuk mengurangi penggunaan energi dan telah diakui dapat meningkatkan efisiensi proses ekstraksi (36). Penggunaan UAE dapat meningkatkan efisiensi proses ekstraksi karena adanya gelombang ultrasonik yang menyebabkan terbentuknya gelembung kavitasi dalam pelarut NADES dan dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada dinding sel tanaman sehingga terjadi pelepasan dan kontak langsung antara senyawa di dalam sel dengan pelarut (37).

Sebelum dilakukan penetapan kadar sampel dalam ekstrak menggunakan HPLC, dilakukan validasi metode analisis terlebih

dahulu. Hasil uji kesesuaian sistem menunjukkan bahwa semua parameter berada dalam rentang persyaratan penerimaannya yang tertulis pada **Tabel 2** sehingga dapat disimpulkan metode analisis yang digunakan memenuhi persyaratan untuk uji kesesuaian sistem (26). Pada parameter linearitas diperoleh persamaan regresi linear untuk standar kafein adalah  $y = 67,178x - 93,573$  dengan nilai  $r$  sebesar 0,9999 dan untuk asam klorogenat diperoleh persamaan regresi linear  $y = 50,289x - 203,14$  dengan nilai  $r$  sebesar 0,9965. Hasil koefisien korelasi ( $r$ ) dari kafein dan asam klorogenat dapat diterima dikarenakan memenuhi persyaratan koefisien korelasi, yaitu nilai  $r > 0,99$  (29). Berdasarkan hasil uji presisi dan akurasi yang dilakukan secara *intraday* dan *interday* diperoleh koefisien variasi  $\leq 2\%$  dan nilai %UPK pada rentang 98-102% sehingga nilai presisi dan akurasi untuk kafein dan asam

klorogenat memenuhi syarat keberterimaan (28). Hasil %KV dan %UPK kafein dan asam klorogenat ditunjukkan pada **Tabel 3**. Pada penelitian ini diperoleh nilai LOD kafein dan asam klorogenat berturut-turut adalah 0,62 ppm dan 4,57 ppm, untuk nilai LOQ kafein dan asam klorogenat berturut-turut adalah 2,08 ppm dan 15,25 ppm.

Setelah dilakukan validasi metode analisis, dilanjutkan dengan evaluasi awal untuk ekstrak cair NADES biji kopi hijau. Evaluasi awal pada hari ke-0 dilakukan pada masing-masing ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z. Masing-masing ekstrak dievaluasi organoleptis, homogenitas, pH, dan penetapan kadar kafein serta asam klorogenatnya. Kemudian untuk ekstrak W, X, Y, dan Z terdapat uji tambahan yang dilakukan, yaitu evaluasi mikrobiologi.

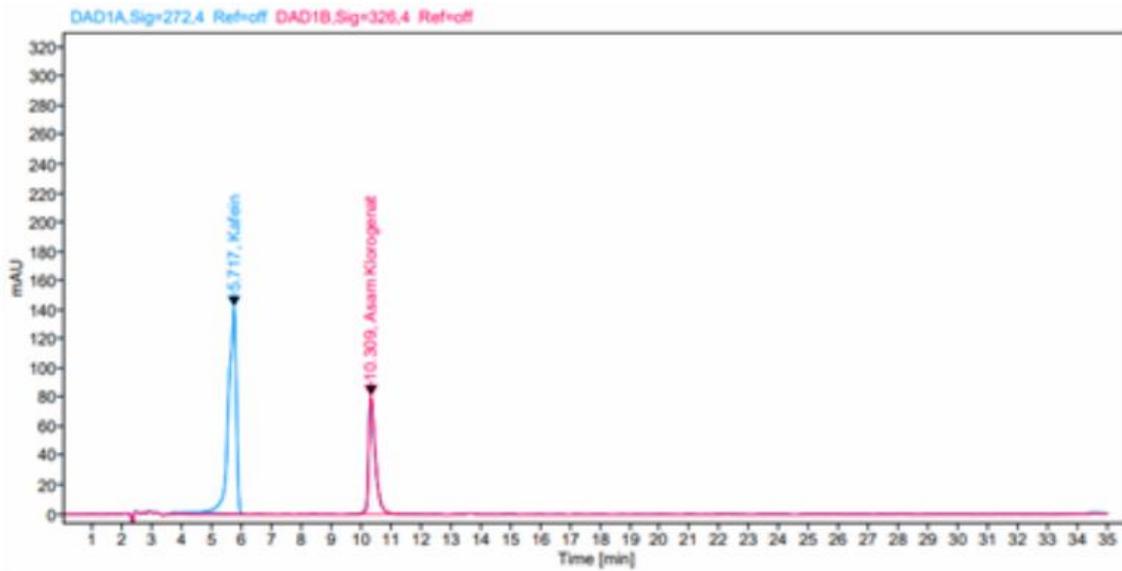
**Tabel 2.** Uji kesesuaian sistem standar kafein dan asam klorogenat.

Standar	Plat teoritis (N) (Rata-rata ± SD)	Tailing Factor (Tf) (Rata-rata ± SD)	%RSD Waktu retensi (%RSD ± SD)	Kesimpulan
Syarat keberterimaan	N > 2000	Tf ≤ 2,0	%RSD < 1,0	Dapat diterima
Kafein	14915,49 ± 1603,35	0,65 ± 0,03	0,75 ± 0,04	Dapat diterima
Asam Klorogenat	71346,89 ± 16769,98	1,39 ± 0,24	0,78 ± 0,08	Dapat diterima

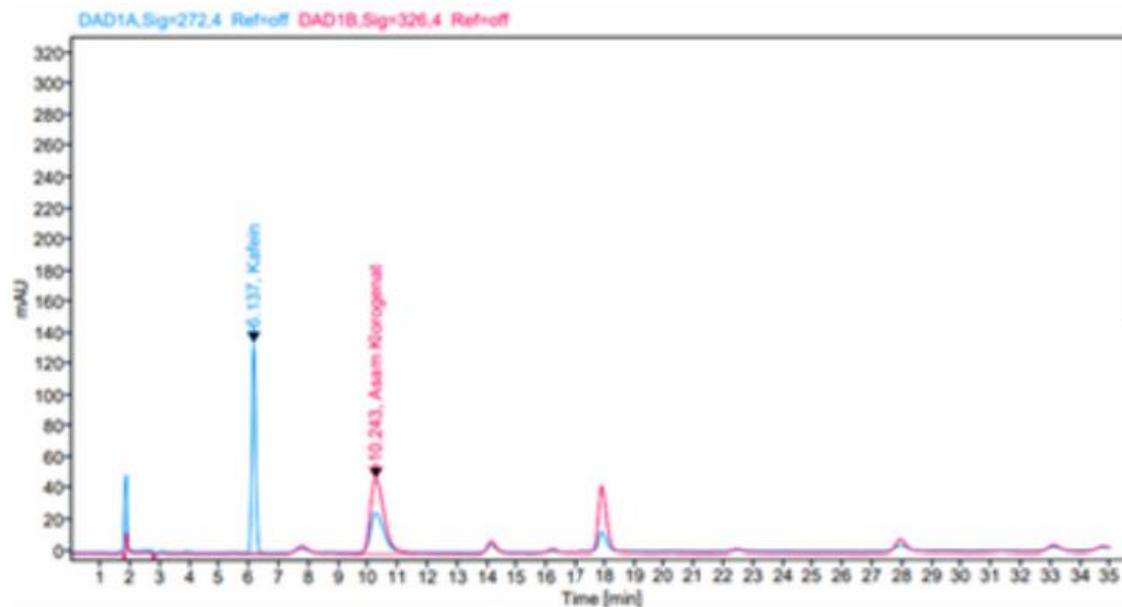
**Tabel 3.** Hasil koefisien variasi (%KV) dan perolehan kembali (%UPK) kafein dan asam klorogenat.

Analit	Kosentrasi (ppm)	<i>Intra-Day</i>		<i>Inter-Day</i>	
		KV (%)	UPK (%)	KV (%)	UPK (%)
Kafein	12,5	0,23	100,71	0,32	100,53
	25	0,16	99,34	0,35	99,38
	50	0,37	100,33	0,43	99,92
Asam Klorogenat	12,5	0,11	99,72	0,21	101,07
	25	0,23	100,30	0,25	99,54
	50	0,35	100,34	0,47	100,04

a)



b)



**Gambar 1.** Kromatogram standar kafein dan asam klorogenat (a) dan sampel uji (b)

Tujuan evaluasi awal, yaitu untuk membandingkan parameter-parameter tersebut sebelum dan sesudah dilakukan uji kestabilan untuk mengetahui stabilitas dari masing-masing ekstrak selama penyimpanan. Hasil evaluasi awal untuk kedelapan ekstrak yaitu memiliki warna, bau, dan homogenitas yang sama. Kedelapan ekstrak berwarna putih kekuningan muda (PMS 100), bersifat homogen, serta memiliki aroma

yang khas, yaitu campuran kopi, NADES, dan etanol. Selanjutnya untuk nilai pH pada ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z secara berturut-turut, yaitu 5,84; 5,85; 5,86; 5,84; 5,59; 5,58; 5,58 dan 5,85. Perolehan kadar kafein pada hari ke-0 untuk ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z secara berturut-turut, yaitu  $21,42 \pm 0,08$  mg/g;  $21,52 \pm 0,08$  mg/g;  $21,60 \pm 0,24$  mg/g;  $21,56 \pm 0,07$  mg/g;  $29,35 \pm 0,29$  mg/g;  $28,73 \pm 0,55$ mg/g;  $28,45 \pm 0,13$  mg/g;

serta  $28,46 \pm 0,05$  mg/g serbuk biji kopi hijau. Kemudian untuk kadar asam klorogenat pada hari ke-0 pada ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z secara berturut-turut, yaitu  $47,93 \pm 0,01$  mg/g;  $47,90 \pm 0,01$  mg/g;  $47,94 \pm 0,02$  mg/g;  $47,94 \pm 0,03$  mg/g;  $55,77 \pm 0,22$  mg/g;  $55,94 \pm 0,43$  mg/g;  $55,74 \pm 0,19$  mg/g; serta  $55,62 \pm 0,18$  mg/g serbuk biji kopi hijau. Jumlah cemaran mikroba ekstrak W, X, Y, dan Z hari ke-0 secara berturut-turut berada pada kisaran 310-435 cfu/mL, 425-540 cfu/mL, 460-525 cfu/mL, dan 615-680 cfu/mL. Kromatogram standar kafein dan asam klorogenat dengan sampel ekstrak cair NADES biji kopi hijau ditunjukkan pada **Gambar 1**.

Perubahan warna yang terjadi pada kedelapan ekstrak pada masing-masing suhu penyimpanan selama 54 hari dapat dilihat pada **Tabel 4**. Namun, perubahan warna yang terjadi

pada setiap masing-masing ekstrak tidak terlalu berbeda jauh bila dibandingkan dengan hari ke-0. Secara berurutan ekstrak yang mengalami perubahan warna lebih cepat dan gelap pada percobaan pertama adalah ekstrak  $D > A > B > C$ , kemudian percobaan kedua adalah ekstrak  $Z > Y > X > W$ . Kemudian kondisi suhu penyimpanan secara berurutan yang paling mempengaruhi perubahan warna lebih cepat dan gelap, yaitu  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C} > -20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Hasil menunjukkan bahwa kedelapan ekstrak yang disimpan pada ketiga suhu yang berbeda selama 54 hari tidak menunjukkan terjadinya perubahan bau atau tidak berbau tengik. Hasil uji homogenitas juga menunjukkan ekstrak tetap homogen selama penyimpanan yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan padat (kristal) (38).

**Tabel 4.** Hasil pengamatan organoleptis ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z pada ketiga suhu penyimpanan selama 54 hari.

Ekstrak	Perubahan Warna		
	$-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$	$5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
A	Tidak mengalami perubahan	Hari ke-54 (PMS 106)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)
B	Tidak mengalami perubahan	Tidak mengalami perubahan	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)
C	Tidak mengalami perubahan	Tidak mengalami perubahan	Hari ke-54 (PMS 106)
D	Tidak mengalami perubahan	Hari ke-36 dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18 (PMS 106); Hari ke-36 dan 54 (PMS 113)
W	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)
X	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)
Y	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)
Z	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)

Keterangan: PMS 100 = Putih kekuningan muda; PMS 106 = Putih kekuningan gelap

Perubahan warna dan bau dapat terjadi karena adanya reaksi oksidatif yang menghasilkan radikal bebas (13). Oksidasi itu sendiri dapat dipengaruhi oleh oksigen, suhu, dan cahaya (11). Perubahan warna dapat terjadi karena reaksi oksidasi dari senyawa fenolik, seperti asam klorogenat dengan pengaruh suhu yang semakin tinggi membuat kandungan fenolik pada ekstrak semakin mudah teroksidasi dan menyebabkan pembentukan pigmen yang lebih gelap (39, 40). Selain itu, perubahan warna yang terjadi pada ekstrak cair juga dapat disebabkan karena adanya hasil metabolit yang diproduksi oleh bakteri yang terdapat dalam ekstrak cair tersebut sehingga menyebabkan terjadinya perubahan warna (41). Selain itu, bakteri juga dapat mendegradasi senyawa fenolik yang terkandung dalam ekstrak cair biji kopi hijau sehingga menyebabkan terjadinya perubahan warna pada ekstrak (42).

Pada penelitian ini, ekstrak yang ditambahkan BHT mengalami perubahan warna lebih lambat dibandingkan dengan ekstrak NADES biji kopi hijau tanpa penambahan BHT. Oksidasi dapat diminimalkan dengan penambahan antioksidan untuk menjaga kualitas ekstrak dengan menghambat produk oksidasi sehingga dapat memperlambat perubahan warna dan ketengikan. BHT berperan sebagai *free radical scavengers* yang bereaksi dengan radikal bebas untuk mendonorkan hidrogen pada radikal bebas sehingga dapat memecah rantai radikal bebas dan menghasilkan radikal bebas yang stabil atau non reaktif sehingga dapat mencegah oksidasi lebih lanjut pada ekstrak (13). Selain itu, semakin meningkatnya konsentrasi BHT yang ditambahkan maka perubahan warna juga semakin lambat yang berarti semakin tinggi konsentrasi BHT maka semakin tinggi juga aktivitas antioksidannya sehingga dapat menjaga kestabilan warna lebih baik. Pada penelitian ini, semakin rendah suhu penyimpanan pada ekstrak maka akan semakin lama perubahan warna dapat terjadi. Hal ini disebabkan pada suhu rendah dapat menurunkan laju reaksi oksidasi enzimatik penyebab warna pada ekstrak menjadi lebih gelap (40). Oleh karena itu, keempat ekstrak yang disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  tidak mengalami perubahan warna.

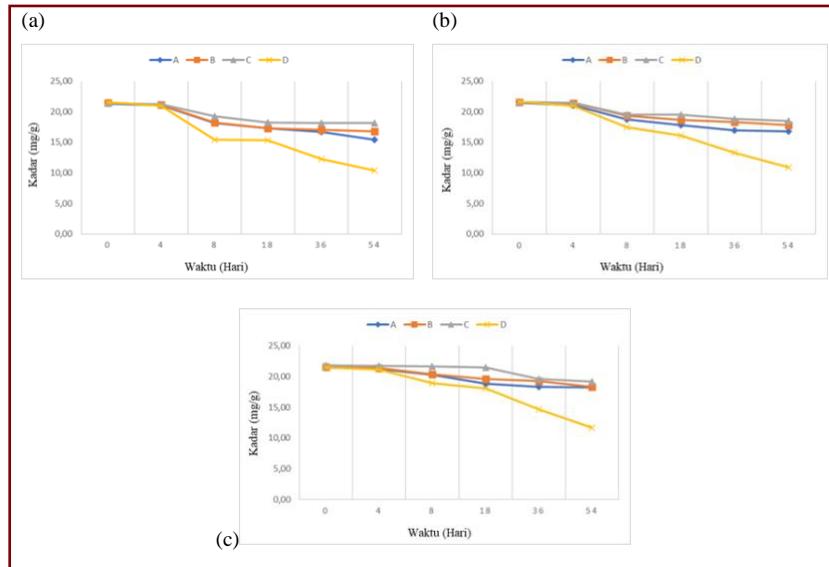
Pada penelitian ini, secara umum ekstrak cenderung mengalami penurunan pH dengan semakin bertambahnya waktu penyimpanan. Penurunan nilai pH ini dapat disebabkan oleh reaksi oksidasi yang terjadi pada senyawa polifenol dalam ekstrak sehingga terjadi pelepasan  $\text{H}^+$  yang dapat menambah keasaman pada ekstrak (39). Selain itu, terjadinya penurunan pH pada ekstrak dapat disebabkan karena adanya pengaruh dari bakteri. Bakteri dapat mengubah pH suatu ekstrak dengan cara memproduksi asam laktat sebagai produk hasil metabolitnya yang dapat menyebabkan terjadinya penurunan pH (43).

Nilai pH yang dihasilkan dari keempat ekstrak A, B, C, dan D pada masing-masing suhu penyimpanan hingga hari ke-54 masih berada pada kisaran pH 5,71-5,62, sedangkan ekstrak W, X, Y berada pada kisaran pH 5,59-5,35, dan ekstrak Z berada pada kisaran pH 5,85-5,62. Terdapat sedikit perbedaan pH antara ekstrak cair NADES biji kopi hijau yang ditambahkan pengawet dengan ekstrak tanpa penambahan pengawet. Hal ini mungkin disebabkan karena struktur dari metil paraben dan propil paraben yang merupakan turunan dari asam p-hidroksibenzoat serta pada struktur metil paraben dan propil paraben terdapat gugus OH yang menyebabkan metil paraben dan propil paraben bersifat sedikit asam dalam suatu larutan (44, 45). Pada kisaran pH 3-9 kandungan asam klorogenat dalam ekstrak cair biji kopi masih stabil dan untuk kafein berada pada kisaran pH 5,5-9 (46, 47). Pengukuran pH itu sendiri bertujuan untuk mengetahui pH dari suatu ekstrak yang berkaitan dengan stabilitas zat aktif yang terkandung dalam ekstrak, dengan demikian nilai pH yang dihasilkan oleh keempat ekstrak pada tiga suhu penyimpanan selama 54 hari masih berada dalam kisaran nilai pH untuk menjaga kestabilan dari asam klorogenat dan kafein sehingga perubahan nilai pH masih dapat diterima.

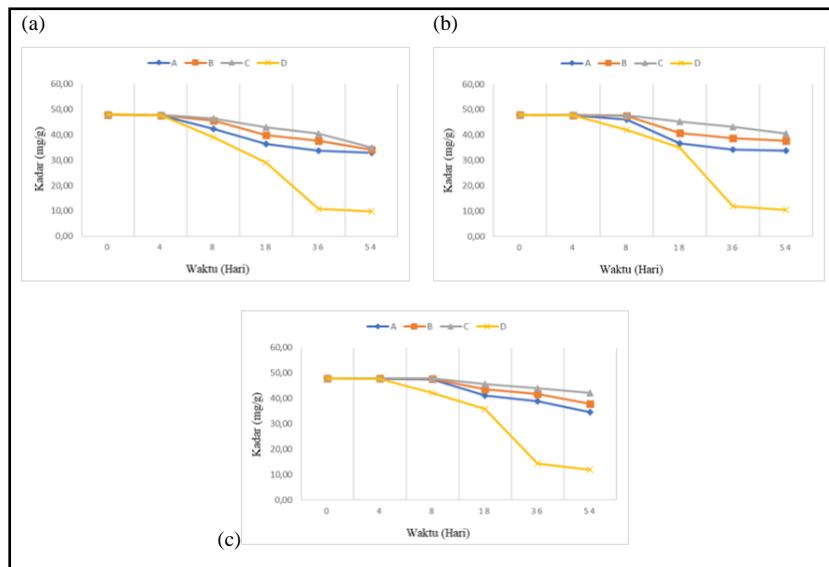
Berdasarkan *guideline* dari *European Medicines Agency* (EMA), stabilitas ekstrak dapat dilihat berdasarkan persentase penurunan dari kadar suatu senyawa yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Batas penerimaan untuk menentukan apakah persentase penurunan kadar senyawa dalam ekstrak masih dapat diterima

atau tidak adalah sebesar  $\pm 5\%$  dari kadar awalnya (19). Persentase penurunan kadar dalam ekstrak dapat digunakan untuk menentukan umur simpan suatu ekstrak. Kurva pengukuran kadar kafein dan asam klorogenat pada ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z pada ketiga suhu penyimpanan selama 54 hari ditunjukkan **Gambar 2 - 5**.

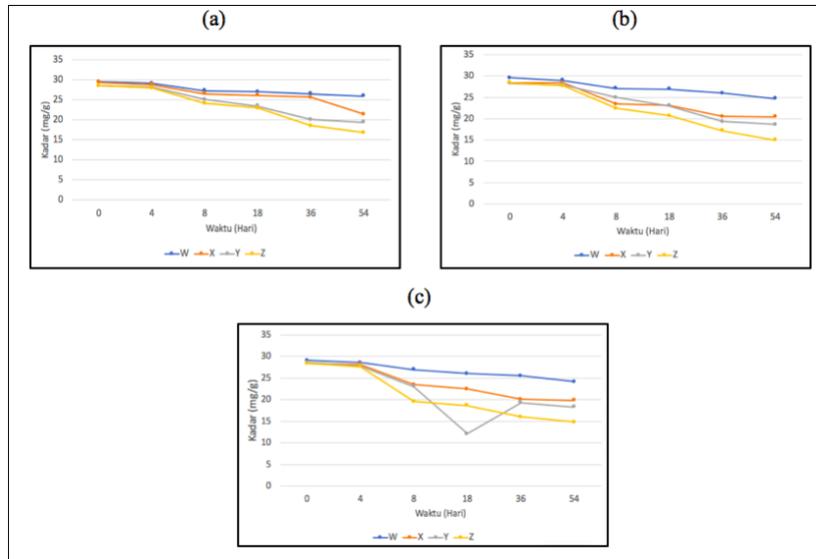
Berdasarkan hasil pengujian dan pengamatan, senyawa kafein pada ekstrak A, B, dan C yang disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  secara berturut-turut stabil hingga hari ke-18, 18, dan 36. Pada suhu  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  dan  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , senyawa kafein pada ekstrak A, B, dan C stabil hingga hari ke-8. Kemudian, senyawa kafein pada ekstrak D, W, X, Y, dan Z pada ketiga suhu penyimpanan stabil hingga hari ke-8.



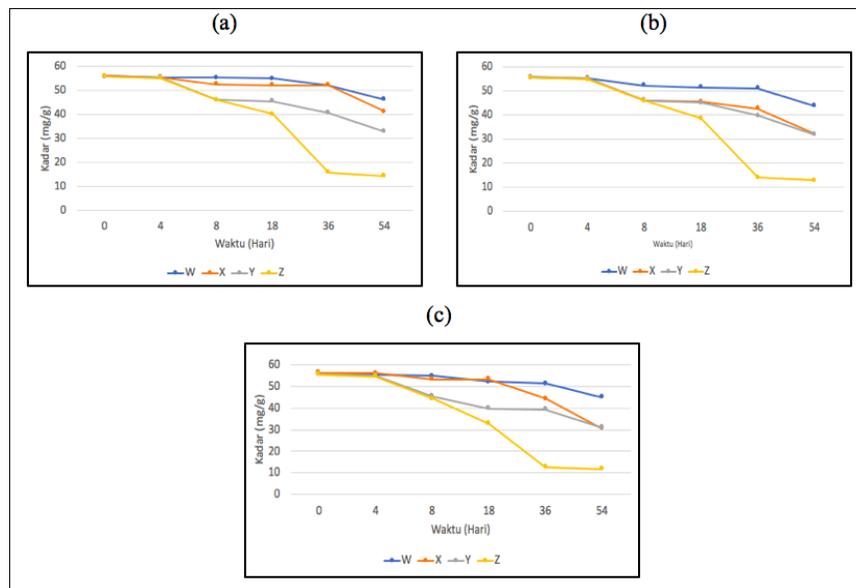
**Gambar 2.** Kurva pengukuran kadar kafein ekstrak A, B, C, dan D pada suhu  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (a),  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (b), dan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  (c) selama 54 hari



**Gambar 3.** Kurva pengukuran kadar asam klorogenat ekstrak A, B, C, dan D pada suhu  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (a),  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (b), dan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  (c) selama 54 hari



**Gambar 4.** Kurva pengukuran kadar kafein ekstrak W, X, Y, dan Z pada suhu  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (a),  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (b), dan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  (c) selama 54 hari



**Gambar 5.** Kurva pengukuran kadar asam klorogenat ekstrak W, X, Y, dan Z pada suhu  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (a),  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (b), dan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  (c) selama 54 hari

Kadar senyawa asam klorogenat pada suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  pada ekstrak A dan B stabil hingga hari ke-18, ekstrak C dan W hingga hari ke-36, serta untuk ekstrak X dan Y stabil hingga hari ke-8. Pada suhu penyimpanan  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , ekstrak A dan B stabil sampai hari ke-18, ekstrak C hingga hari ke-36, ekstrak W, X, dan Y stabil hingga hari ke-8. Pada suhu penyimpanan  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , senyawa asam klorogenat ekstrak A

stabil hingga hari ke-8, ekstrak B dan C hingga hari ke-18. Ekstrak W stabil hingga hari ke-18, sedangkan ekstrak X dan Y stabil hingga hari ke-8. Kemudian untuk ekstrak D dan Z pada masing-masing suhu penyimpanan stabil hingga hari ke-8.

Berdasarkan hasil yang didapatkan ekstrak cair NADES biji kopi hijau dengan penambahan BHT 30 ppm dan disimpan pada

suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  memiliki kestabilan kadar kafein dan asam klorogenat yang paling optimal, yaitu hingga hari ke-36. Hasil persentase penurunan kadar kafein dan asam klorogenat yang paling rendah pada ketiga suhu penyimpanan secara berturut-turut, yaitu pada ekstrak  $C > B > A > D$ . Hasil persentase penurunan kadar kafein dan asam klorogenat yang paling rendah pada masing-masing ekstrak secara berturut-turut adalah pada suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C} > 30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Ekstrak dengan penambahan pengawet, dapat disimpulkan bahwa ekstrak dengan penambahan pengawet kombinasi metil paraben dan propil paraben konsentrasi 110 ppm dan 55 ppm pada suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  memiliki kadar kafein dan asam klorogenat paling stabil karena baru mengalami penurunan kadar lebih dari 5% dari kadar awalnya pada hari ke-8 untuk senyawa kafein dan hari ke-36 untuk senyawa asam klorogenat. Secara umum, persentase penurunan kadar kafein dan asam klorogenat sampai hari ke-54, berturut-turut paling besar terjadi pada ekstrak  $Z > Y > X > W$ . Sedangkan, persen penurunan kadar kafein berturut-turut pada ekstrak W, X, Y, dan Z sampai hari ke-54 berdasarkan pada suhu penyimpanan secara umum paling besar terjadi pada suhu penyimpanan  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C} > -20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Untuk senyawa asam klorogenat, sulit untuk menentukan urutan persentase penurunan kadar dari berbagai suhu penyimpanan karena pada ekstrak W dan X, persentase penurunan kadarnya lebih besar pada suhu  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  dibandingkan  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Hal ini mungkin disebabkan karena adanya perubahan suhu yang terjadi pada kondisi penyimpanan  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  sehingga memengaruhi kadar senyawa asam klorogenat yang merupakan senyawa yang bersifat termolabil. Namun, secara umum, persentase penurunan kadar asam klorogenat paling rendah berada pada suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ .

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh bahwa penambahan BHT dan suhu penyimpanan rendah pada ekstrak cair NADES biji kopi hijau dapat menjaga kestabilan kimia pada ekstrak lebih lama, menghasilkan presentase penurunan kadar yang lebih kecil, dan menghasilkan kadar senyawa aktif yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak cair NADES biji kopi hijau tanpa

penambahan BHT. Reaksi oksidasi ini dapat menghasilkan radikal bebas yang akan menghasilkan oksidasi zat aktif sehingga akan mengurangi *shelf-life* (umur simpan) dari ekstrak yang didapat (13). Oleh karena itu, penambahan BHT sebagai antioksidan sintetik ke dalam ekstrak NADES dapat meningkatkan stabilitas kimia pada ekstrak dengan mencegah oksidasi. BHT berperan sebagai antioksidan sintetik yang bekerja sebagai *free radical scavengers* dan akan bereaksi dengan radikal bebas dengan mendonorkan hidrogen pada radikal bebas sehingga menghasilkan radikal bebas yang stabil dan non reaktif dengan begitu dapat menghentikan reaksi oksidasi dan mencegah oksidasi lebih lanjut (13). Penambahan BHT sebagai antioksidan sintetik berperan untuk menjaga kualitas ekstrak dengan memperlambat kerusakan yang disebabkan radikal bebas dan meningkatkan stabilitas kimia yang berpengaruh pada umur simpan pada ekstrak. Selain itu, semakin tinggi konsentrasi BHT yang ditambahkan maka semakin lama juga untuk menjaga kestabilan kimia pada ekstrak yang menunjukkan bahwa semakin tinggi penambahan konsentrasi BHT, maka akan semakin kuat aktivitas antioksidan dalam ekstrak tersebut untuk menjaga kestabilan kimia pada ekstrak. Selain penambahan BHT, metode yang dapat digunakan untuk menghambat oksidasi dapat dilakukan dengan penyimpanan pada suhu rendah (17). Oleh karena itu, ekstrak cair NADES biji kopi hijau dengan penambahan BHT 30 ppm dan disimpan pada kondisi penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  memiliki kestabilan kadar kafein dan asam klorogenat yang paling stabil selama penyimpanan.

Penurunan kadar senyawa kafein dan asam klorogenat juga dapat disebabkan karena adanya pertumbuhan bakteri pada ekstrak. Bakteri dapat menyebabkan terjadinya degradasi pada kafein karena senyawa kafein merupakan sumber karbon dan nitrogen bagi pertumbuhan bakteri (48). Bakteri mendegradasi senyawa kafein melalui jalur demetilasi dengan bantuan enzim N-demetilase (49). Enzim N-demetilase menyebabkan terjadinya demetilasi berurutan pada tiga kelompok N-metil yang terdapat pada kafein (48). Awalnya kafein diubah menjadi teobromin (3,7-dimetilxantin) dan paraxantin (1,7-dimetilxantin) dengan bantuan enzim N-

demetilase yang melepaskan gugus metil dari posisi N-1 dan N-3 pada molekul kafein (48, 49). Kemudian demetilasi lebih lanjut menghasilkan xanthine dengan 7-metilxanthine sebagai produk *intermediate* (48). Produk akhir katabolisme kafein berfungsi sebagai sumber nutrisi bagi bakteri untuk pemeliharaan pertumbuhan dan aktivitas metabolisme (48). Bakteri juga dapat menyebabkan degradasi pada senyawa asam klorogenat karena asam klorogenat merupakan sumber karbon bagi bakteri (50). Degradasi senyawa asam klorogenat dapat terjadi karena adanya aksi esterase dari bakteri yang menyebabkan terjadinya degradasi senyawa asam klorogenat sehingga menghasilkan produk katabolik pertama berupa asam kafeat yang merupakan hasil pecahan dari asam klorogenat (51). Terjadinya degradasi pada senyawa kafein dan asam klorogenat dapat memengaruhi kadar senyawa kafein dan asam klorogenat sehingga menyebabkan penurunan kadar terhadap kedua senyawa tersebut. Selain itu, penurunan kadar kafein dan asam klorogenat juga dapat disebabkan karena NADES yang sudah tidak stabil akibat adanya cemaran bakteri. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Radošević *et al.*, 2018 dan Zhao *et al.*, 2015 disebutkan bahwa kolin klorida dan sorbitol yang merupakan golongan gula alkohol sebagai penyusun NADES tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri (52, 53). Sorbitol dapat digunakan sebagai sumber nutrisi nitrogen atau karbon bagi beberapa bakteri dan golongan gula alkohol ini dapat dicerna oleh bakteri (52, 53). Hal ini dapat menyebabkan NADES menjadi tidak stabil sehingga memengaruhi kadar senyawa kafein dan asam klorogenat pada ekstrak.

Berdasarkan hasil pengamatan, kadar kafein dan asam klorogenat dapat lebih terjaga pada ekstrak yang ditambahkan kombinasi metil paraben dan propil paraben sebagai pengawet, terutama ekstrak W yang ditambahkan kombinasi metil paraben dan propil paraben konsentrasi 110 ppm dan 55 ppm dan suhu penyimpanan juga merupakan salah satu faktor yang memengaruhi karena suhu penyimpanan yang lebih tinggi dapat mempercepat pertumbuhan bakteri sedangkan temperatur rendah dapat memperlambat proses terjadinya perubahan kimia dan pertumbuhan bakteri (54). Metil paraben dan propil paraben merupakan pengawet sehingga dapat membantu

menjaga kadar kafein dan asam klorogenat dari degradasi senyawa yang disebabkan oleh bakteri. Sampai saat ini, belum diketahui dengan pasti bagaimana mekanisme aksi dari paraben. Namun, menurut beberapa literatur, disebutkan bahwa paraben memiliki beberapa mekanisme aksi terhadap bakteri. Mekanisme aksi dari paraben, yaitu paraben dapat menginduksi permeabilisasi membran bakteri sehingga menyebabkan pelepasan molekul intraseluler (55). Hipotesis lain juga menyebutkan bahwa mekanisme kerja paraben pada *phospholipid bilayer* membran sitoplasma menyebabkan peningkatan permeabilitas dan fluiditas sehingga menyebabkan terjadinya gangguan dan kebocoran transpor membrane (56).

Jumlah cemaran mikroba dari hari ke-0 sampai hari ke-54 yang terdapat pada ekstrak W, X, Y, dan Z pada masing-masing suhu penyimpanan cenderung menurun. Hal ini dapat disebabkan karena adanya penambahan kombinasi metil paraben dan propil paraben pada ekstrak W, X, dan Z. Kombinasi metil paraben dan propil paraben dapat memberikan efek bakterisid (membunuh bakteri), sebaliknya jika metil paraben dan propil paraben penggunaannya tidak dikombinasikan hanya dapat memberikan efek penghambatan pertumbuhan bakteri (57). Sedangkan, pada ekstrak Z yang tidak ditambahkan kombinasi metil paraben dan propil paraben memiliki jumlah cemaran yang cenderung lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak A, B, dan C yang ditambahkan kombinasi metil paraben dan propil paraben. Selain itu, penurunan jumlah cemaran yang terjadi pada ekstrak D dapat disebabkan karena ekstrak kopi itu sendiri telah dibuktikan memiliki aktivitas antimikroba. Senyawa kimia yang terkandung dalam kopi menyebabkan ekstrak kopi memiliki aktivitas antimikroba (58). Senyawa kimia yang memberikan efek antimikroba pada ekstrak kopi adalah senyawa polifenol (59). Senyawa polifenol yang memberikan efek antimikroba diduga bekerja dengan cara menyebabkan perubahan permeabilitas membran bakteri (59). Selain itu, terdapat hipotesis lain yang menyebutkan bahwa senyawa tanin yang terkandung dalam ekstrak kopi dapat mengendapkan protein pada membran sel bakteri (60).

Berdasarkan petunjuk dari *European Medicines Agency*, disebutkan bahwa kriteria penerimaan jumlah cemaran mikroba yang terkandung dalam ekstrak mengikuti kriteria penerimaan yang terdapat pada *European Pharmacopoeia, chapter 5.1.8*. Berdasarkan *European Pharmacopoeia, Edisi 10, chapter 5.1.8* disebutkan bahwa kriteria penerimaan jumlah cemaran mikroba dari hasil uji angka lempeng total tidak boleh melebihi  $10^5$  koloni/mL atau 500.000 koloni/mL. Kriteria penerimaan jumlah cemaran maksimal yang diperbolehkan terkandung dalam ekstrak ini dapat digunakan juga untuk menentukan umur simpan ekstrak. Berdasarkan hal tersebut, dapat disimpulkan bahwa jumlah cemaran mikroba yang terdapat pada ekstrak W, X, Y, dan Z pada suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , dan  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  yang disimpan dari hari ke-0 sampai hari ke-54 tidak ada yang melebihi batas jumlah penerimaan mikroba dalam ekstrak. Namun, pada hari ke-18, jumlah cemaran pada ekstrak Z yang disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  dan  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  serta ekstrak W, X, dan Y yang disimpan pada suhu  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , jumlahnya terlalu banyak sehingga tidak dapat dihitung. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya kesalahan dalam proses pengerjaannya sehingga pada beberapa cawan petri terjadi kontaminasi. Diduga kontaminasi tersebut berasal dari *micropipette* yang digunakan. Namun, secara umum sampai hari ke-54, metil paraben dan propil paraben yang ditambahkan ke dalam ekstrak sebagai pengawet dapat menjaga jumlah cemaran mikroba yang terdapat dalam ekstrak sehingga tidak melebihi batas penerimaannya.

## Kesimpulan

Penambahan BHT dan antimikroba (kombinasi metil dan propil paraben) pada ekstrak cair NADES dapat meningkatkan stabilitas ekstrak, baik secara fisik maupun mikrobiologi. Ekstrak cair NADES yang ditambahkan BHT konsentrasi 30 ppm dengan suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  memiliki stabilitas fisik dan kimia yang paling optimal. Sedangkan, untuk ekstrak cair NADES yang ditambahkan kombinasi metil paraben dan propil paraben konsentrasi 110:55 ppm dengan suhu penyimpanan  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  memiliki stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi yang paling optimal.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis ucapkan terimakasih kepada Universitas Indonesia dan pihak-pihak terkait yang telah memfasilitasi dan membantu berjalannya penelitian ini.

## Referensi

1. Chu YF, editor. Coffee: emerging health effects and disease prevention. John Wiley & Sons; 2012 Mar 27.
2. Garg, Satish K. "Green Coffee Bean." *Nutraceuticals*, 2016, pp. 653-667, 10.1016/b978-0-12-802147-7.00047-4.
3. Lashermes P. Achieving sustainable cultivation of coffee: breeding and quality traits. Burleigh Dodds Science Publishing Limited; 2018.
4. Choi YH, Verpoorte R. Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products: from supercritical fluid extraction to ionic liquids and deep eutectic solvents. *Current Opinion in Food Science*. 2019 Apr 15;26:87-93.
5. Espino M. M. dl Á. Fernández, FJV Gomez and M. Fernanda Silva. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.* 2016;76:126-36.
6. Kua Y, Gan S. Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) as a Greener Alternative for the Extraction of Hydrophilic (Polar) and Lipophilic (Non-Polar) Phytonutrients. *Key Engineering Materials*. 2019;797:20-28.
7. González CG, Mustafa NR, Wilson EG, Verpoorte R, Choi YH. Application of natural deep eutectic solvents for the "green" extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour and Fragrance Journal*. 2018 Jan;33(1):91-6.
8. Freitas Araujo M, Maria T. Microbial Quality of Medicinal Plant Materials. *Latest Research into Quality Control*. 2012.
9. Thakur L, Ghodasra U, Patel N, Dabhi M. Novel approaches for stability improvement in natural medicines. *Pharmacognosy Reviews*. 2011;5(9):48.
10. European Medicines Agency. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products.

- European Medicines Agency, Inspections; 2018 p. 1-18.
11. Lourenço SC, Moldão-Martins, M, Alves, VD. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*. 2019(24):4132.
  12. Obzansky, David Michael. Method for preparing aqueous analytical reagents containing water insoluble antioxidant. European Patent Application. 1989
  13. García-García R, Searle S. Preservatives: Food Use. *Encyclopedia of Food and Health*. 2016;;505-509.
  14. Mishra R, Bisht SS. Antioxidants and their characterization. *J. Pharm. Res.* 2011 Aug;4(8):2744-6.
  15. Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and chemical Toxicology*. 2002 Oct 1;40(10):1335-73.
  16. Ibtissem B, Imen M, Souad S. Dosage of 2, 6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol (BHT) in the plant extract *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010 Jan 1;2010.
  17. Yehye WA, Rahman NA, Ariffin A, Abd Hamid SB, Alhadi AA, Kadir FA, Yaeghoobi M. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European journal of medicinal chemistry*. 2015 Aug 28;101:295-312.
  18. European Medicines Agency. Guideline on Stability Testing : Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products. European Medicines Agency, Inspections; 2007 p. 1-18.
  19. European Medicines Agency. *Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products*. 2018.
  20. Fitri RA, Lestari TA, Sari Y, Sutriyo S, Mun'Im A. Freeze drying of natural deep eutectic solvent (NADES) extract of green coffee bean (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner). *Journal of research in pharmacy (online)*. 2020;24(2):225-32.
  21. Yuniarti E, Saputri FC, Mun'Im A. Natural deep eutectic solvent extraction and evaluation of caffeine and chlorogenic acid from green coffee beans of *Coffea canephora*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019 Dec 31;81(6):1062-9.
  22. Dai Y, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food chemistry*. 2014 Sep 15;159:116-21.
  23. Depkes RI. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat: Jakarta Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Edisi IV. 2000.
  24. PMS Color Used for Printing [Internet]. *Kartonwerken.nl*. 2021 [cited 27 June 2022]. Available from: <http://www.kartonwerken.nl/files/PMS%20kaart.pdf>
  25. Guidance R. Validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Washington. 1994 Nov 1;2.
  26. Seo J, Kim J, Shim J, Yoon G, Bang M, Bae C et al. HPLC Analysis, Optimization of Extraction Conditions and Biological Evaluation of *Corylopsis coreana* Uyeki Flos. *Molecules*. 2016;21(1):94.
  27. International Council on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology. International Council on Harmonisation; 2005 p. 1-13.
  28. Harmita. Analisis fisikokimia: Kromatografi. Jakarta: Kedokteran EGC; 2015.
  29. AOAC A. Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Obtenido de <https://doi.org/10.1063/1.4915424>. 2002.
  30. Jeszka-Skowron M, Sentkowska A, Pyrzyńska K, De Peña MP. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*. 2016 Aug;242(8):1403-9.
  31. Wei F, Tanokura M. Organic compounds in green coffee beans. In *Coffee in health and disease prevention* 2015 Jan 1 (pp. 149-162).

- Academic Press.
32. Makanjuola SA. Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea-ginger blend. *Food science & nutrition*. 2017 Nov;5(6):1179-85.
  33. Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 2004 Jul 28;126(29):9142-7.
  34. Zhang Q, Vigier KD, Royer S, Jérôme F. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(21):7108-46.
  35. Dai Y, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food chemistry*. 2015 Nov 15;187:14-9.
  36. Chemat F, Vian M, Cravotto G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(7):8615-8627.
  37. Ruesgas-Ramón M, Figueroa-Espinoza MC, Durand E. Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017 May 10;65(18):3591-601.
  38. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp, G.-j., Verpoorte, R., Choi, YH. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta*. 2013;766:61-8.
  39. Anggiriiani, M. Uji Stabilitas fisik dan aktivitas antioksidan sediaan krim yang mengandung ekstrak etanol daun Sirih (*Piper betle* L.) dengan penambahan BHT pada berbagai konsentrasi. Universitas Indonesia. 2011.
  40. Pardede, E. Penanganan Reaksi Enzimatika Pencoklatan Pada Buah dan Sayur Serta Produk Olahannya. *VISI*. 2017; 13.
  41. Sandle T. Microbiological challenges to the pharmaceuticals and healthcare. *Pharmaceutical Microbiology*; Woodhead Publishing: Sawston, UK. 2016:281-94.
  42. Minatel IO, Borges CV, Ferreira MI, Gomez HA, Chen CY, Lima GP. Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compd. Biol. Act*. 2017 Mar 8;8:1-24.
  43. Ratzke C, Gore J. Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLoS biology*. 2018 Mar 14;16(3):e2004248.
  44. Alvarez-Rivera G, Llompart M, Lores M, Garcia-Jares C. Preservatives in Cosmetics. *Analysis of Cosmetic Products*. 2018;:175-224.
  45. Lincho J, Gomes J, Martins RC. Paraben Compounds—Part II: An Overview of Advanced Oxidation Processes for Their Degradation. *Applied Sciences*. 2021 Apr 15;11(8):3556.
  46. Abebe B. Some biochemical compounds in coffee beans and methods developed for their analysis. *International Journal of Physical Sciences*. 2011 Nov 9;6(28):6373-8.
  47. Oryza Oil & Fat Chemical CO., L. Coffee bean extract. *Oryza Oil & Fat Chemical CO., LTD*. 2013; 1-41.
  48. Gummadi SN, Bhavya B, Ashok N. Physiology, biochemistry and possible applications of microbial caffeine degradation. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012 Jan;93(2):545-54.
  49. Dash SS, Gummadi SN. Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnology letters*. 2006 Dec;28(24):1993-2002.
  50. Ma Y, Wang X, Nie X, Zhang Z, Yang Z, Nie C, Tang H. Microbial degradation of chlorogenic acid by a *Sphingomonas* sp. strain. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2016 Aug;179(8):1381-92.
  51. Ludwig IA, Paz de Peña M, Concepción C, Alan C. Catabolism of coffee chlorogenic acids by human colonic microbiota. *Biofactors*. 2013 Nov;39(6):623-32.
  52. Radošević K, Čanak I, Panić M, Markov K, Bubalo MC, Frece J, Srček VG, Redovniković

- IR. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018 May;25(14):14188-96.
53. Zhao Y, Wang J, Balleve O, Luo H, Zhang W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. *Hypertens Res*. 2012 Apr;35(4):370-4.
54. Paul-Sadhu S. Impact of low refrigeration temperature on colour of milk. *Acta Alimentaria*. 2016 Sep;45(3):390-7.
55. Bredin J, Davin-Régli A, Pages JM. Propyl paraben induces potassium efflux in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005 Jun 1;55(6):1013-5.
56. Młynarczyk M, Sznitowska M, Watrobska-Swietlikowska D. Antimicrobial Activity of Parabens in Submicron Emulsions Stabilized with Lecithin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008 Jan;34(4):355-62.
57. Gilliland D, Wan Po AL, Scott E. Kinetic evaluation of claimed synergistic paraben combinations using a factorial design. *Journal of Applied Bacteriology*. 1992 Mar;72(3):258-61.
58. Almeida AA, Farah A, Silva DA, Nunan EA, Glória MB. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006 Nov 15;54(23):8738-43.
59. Akhlaghi N, Sadeghi M, Fazeli F, Akhlaghi S, Mehnati M, Sadeghi M. The antibacterial effects of coffee extract, chlorhexidine, and fluoride against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus plantarum*: An in vitro study. *Dental Research Journal*. 2019 Sep;16(5):346.
60. Rajesh G, Rao A, Shenoy R, BH MP. Antimicrobial efficacy of *Punica granatum* mesocarp, *Nelumbo nucifera* leaf, *Psidium guajava* leaf and *Coffea Canephora* extract on common oral pathogens: an in-vitro study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2014 Jul;8(7):ZC65.