

PENETAPAN KADAR TEOBROMIN PADA BUBUK MINUMAN COKELAT DI KECAMATAN UMBULHARJO DENGAN METODE HPLC

DETERMINATION OF THEOBROMINE LEVELS IN CHOCOLATE BEVERAGE POWDER BY HPLC METHOD

Wida Safitri¹, Aprilia Kusbandari^{*2}

ARTICLE INFO

Submitted: 19-04-2022

Revised: 05-04-2022

Accepted: 18-06-2022

^{*1} Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta)

^{*2} Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan)

^{*}Corresponding author (Aprilia Kusbandari)

Email:

aprilia.kusbandari@pharm.uad.ac.id

ABSTRAK

Minuman coklat merupakan salah satu produk olahan coklat yang populer di kalangan masyarakat. Cokelat memiliki berbagai kandungan senyawa aktif diantaranya protein, lemak, karbohidrat, senyawa polifenol, flavonoid serta metilxantin. Teobromin atau 3,7-dimetilxantin merupakan kandungan utama dalam coklat yang termasuk dalam golongan alkaloid metilxantin. Teobromin ini memiliki efek farmakologis sebagai stimulan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar teobromin yang terkandung dalam bubuk minuman coklat dengan metode HPLC. Sampel yang digunakan adalah bubuk minuman coklat yang beredar di Kecamatan Umbulharjo Yogyakarta. Uji kualitatif dilakukan dengan uji Parry, uji Murexide, dan membandingkan waktu retensi sampel terhadap standar teobromin. Analisis kuantitatif dilakukan menggunakan instrumen HPLC dengan fase gerak metanol : akuabides (40:60 v/v) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit, running time 10 menit, pada λ 275 nm dan fase diam C18. Uji kualitatif teobromin dengan uji parry menunjukkan terbentuknya larutan berwarna hijau dan pada uji Murexide terbentuk warna merah violet, serta menghasilkan waktu retensi yang relatif sama yakni 5,789 menit untuk standar dan 5,872 menit untuk sampel. Rata-rata kadar teobromin dari ketiga sampel per takaran untuk satu cup minuman coklat adalah $(18,0433 \pm 0,8298)$ mg $(21,1753 \pm 0,8716)$ mg, dan $(32,1292 \pm 1,4765)$ mg. Kadar teobromin tiap sampel dianalisis dengan Kruskal Wallis dengan taraf kepercayaan 95% dan hasil menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi $0,002 < 0,005$. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa sampel mengandung teobromin yang merupakan senyawa khas yang terkandung dalam coklat.

Kata kunci : *Cokelat, Teobromin, HPLC*

ABSTRACT (Bahasa Inggris) Bold, Times New Roman (10 pt)

Chocolate drinks are one of the processed chocolate products that are popular among the people. Chocolate has a variety of active compounds including protein, fat, carbohydrates, polyphenol compounds, flavonoids and methylxanthine. Theobromine or 3,7-dimethylxanthine is the main ingredient in chocolate which belongs to the methylxanthine alkaloid group. This theobromine has a pharmacological effect as a stimulant. The purpose of this study was to determine theobromine levels contained in chocolate drink powder using the HPLC method. The sample used is chocolate drink beverage in the Umbulharjo Sub-District of Yogyakarta. Qualitative tests were carried out by the Parry test, the Murexide test, and comparing the retention times of samples to theobromine standards. Quantitative analysis was carried out using HPLC instruments with the mobile phase of methanol : water (40:60 v/v) with flow rate of 0.8 mL/minute, running time of 10 minutes, at λ 275 nm and stationary phase C18. Theobromine qualitative test showed that the sample contained theobromine with the Parry test is green solution, and in the Murexide test is violet red as well as the produced a relatively similar retention time of 5,789 minutes for the standard and 5,872 minutes for the sample. The average theobromine level of the three samples per dose for one cup of chocolate beverage was $(18,0433 \pm 0,8298)$ mg, $(21,1753 \pm 0,8716)$ mg, dan $(32,1292 \pm 1,4765)$ mg. Theobromine content of each sample was analyzed by Kruskal Wallis with a confidence level of 95% and the results showed a significant difference with a significance value of 0.002

<0.005. From the results of the study concluded that the sample contains theobromine which is a distinctive compound which is contained in chocolate.

Keywords: Chocolate, Theobromine, HPLC

1. PENDAHULUAN

Cokelat merupakan salah satu makanan yang sering dikonsumsi oleh masyarakat umum, mulai dari anak kecil sampai orang dewasa. Perkembangan teknologi membuat cokelat tidak hanya dinikmati dalam bentuk buah cokelat saja, namun sekarang ini cokelat dapat diolah menjadi beranekaragam bentuk makanan, diantaranya cokelat batangan, permen cokelat, biskuit cokelat, ice cream, minuman, dan serbuk cokelat. Minuman cokelat merupakan salah satu bentuk olahan cokelat yang cukup populer dan banyak digemari masyarakat luas. Begitu juga di Kecamatan Umbulharjo diketahui banyak produk cokelat yang dijual dalam berbagai bentuk sediaan.

Cokelat diketahui memiliki kandungan yang beragam, antara lain protein, lemak, karbohidrat, senyawa polifenol, flavonoid serta metilxantin (Rodriguez *et al.*, 2012). Metilxantin merupakan derivat xantin yang mengandung gugus metil, yang termasuk di dalamnya adalah kafein, teobromin, dan teofilin (Meng *et al.*, 2009). Teobromin merupakan metilxantin utama yang ditemukan dalam kakao (*Theobroma cacao* L) (Junaidi *et al.*, 2007).

Teobromin adalah senyawa yang paling banyak terdapat dalam biji kakao yaitu sebesar 1-4% dan lebih banyak terdapat dalam keping biji sebesar 2,2-2,7% dibandingkan pada kulit biji hanya sekitar 0,75% (Lim, 2012). Teobromin memberikan rasa pahit khas pada biji kakao dan memiliki efek stimulan, relaksasi otot polos, dan diuretik. Efek stimulan yang dihasilkan teobromin ini dapat meningkatkan kewaspadaan, memperbaiki suasana hati, serta dapat mencegah atau mengurangi stres. Konsumsi berlebih teobromin juga tidak dianjurkan karena dapat dimungkinkan menyebabkan adiksi (Czech *et al.*, 2011)

Metode analisis kuantitatif dituntut untuk memberikan ketelitian, ketepatan, selektivitas dan kecepatan yang tinggi, sehingga HPLC menjadi metode yang dipilih karena memenuhi spesifikasi tersebut. Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik untuk menetapkan kadar teobromin dalam produk minuman cokelat yang beredar di Kecamatan Umbulharjo dengan metode HPLC.

2. METODE

Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah beberapa sampel bubuk minuman cokelat yang beredar di Kecamatan Umbulharjo Yogyakarta pada tahun 2019

Alat

Alat gelas, *waterbath*, *hot-plate*, *heating mantle*, timbangan analitik, sonikator, instrumen HPLC LC-20AT dengan detektor SPD-20A SHIMADZU.

Bahan

Baku teobromin, Etanol *p.a*, Eter, Akuabides, Metanol *grade* HPLC, Aqua pro injeksi, H₂O₂ 3%, HCl 2%, ammonia 5%, Kobalt Nitrat, dan sampel bubuk minuman cokelat.

Preparasi Sampel

Proses ekstraksi teobromin ini menggunakan metode Pavia (1973) yang telah dimodifikasi oleh Junaidi., *et al* (2007), dimana sampel ditimbang sebanyak 10,0 g dimasukkan dalam gelas piala tambahkan 20 ml aquadest dan 10 ml etanol, kemudian dipanaskan hingga hampir kering. Setelah itu sampel ditambah etanol hingga 100,0 ml kemudian dipanaskan selama 30 menit. Setelah itu dilakukan penyaringan dalam keadaan panas untuk memisahkan filtrat dan residu. Residu diekstrak ulang menggunakan etanol dan hasil ekstrak ulang tersebut dicampurkan dengan filtrat yang diperoleh sebelumnya lalu diuapkan hingga tersisa sekitar 5-10 ml filtrat, kemudian didinginkan. Hasil ekstraksi tersebut ditambah dengan 30 ml eter dan diendapkan semalam kemudian endapan disaring dan dicuci dengan 10 mL eter sebanyak 5 kali.

Analisis Kualitatif

Uji Parry

Sejumlah sampel dilarutkan dalam metanol tambahkan reagen Parry dan ammonia encer akan timbul warna biru tua atau hijau.(Maramis *et al.*, 2013).

Uji Murexide

Sejumlah sampel ditambah dengan 40 ml H₂O₂ 3% dan 1-2 tetes HCl 2% lalu panaskan di atas *waterbath* dan uapkan sampai kering, sehingga diperoleh warna pink. Warna berubah menjadi merah violet dengan penambahan beberapa tetes amonia 5% (Marliana, 2015).

Waktu retensi

Hasil kromatogram sampel dibandingkan dengan hasil kromatogram standar teobromin

Kondisi Kromatografi

Pada penelitian ini digunakan kolom yang digunakan C18 250 x 4,6 mm, fase gerak dengan komposisi metanol : aquabides (40:60). Detektor diatur pada panjang gelombang 275 nm dan *running time* 10 menit dengan *flowrate* 0,8 ml/menit.

Validasi Metode Analisis (Alvi dan Hammami, 2011)

Kesesuaian sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar teobromin dengan konsentrasi 50 µg/mL sebanyak 6 kali.

Linearitas

Standar teobromin ditimbang 25,0 mg dan dilarutkan dalam 25,0 ml metanol sehingga diperoleh larutan stok konsentrasi 1 mg/mL. Kemudian dibuat seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100, dan 120 µg/mL. Linearitas diperoleh dengan memplotkan hubungan antara konsentrasi dengan AUC (*Area Under Curve*) sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = bx + a$.

Presisi

Larutan baku dengan konsentrasi 20, 60 dan 100 µg/mL masing-masing diinjeksikan sebanyak 3 kali kedalam sistem HPLC, kemudian ditetapkan kadarnya berdasarkan persamaan dari kurva baku yang diperoleh. Selanjutnya hitung nilai *mean*, *SD* (*Standard Deviation*) dan % *Relative Standard Deviation* (RSD).

Akurasi

Akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku, dimana 20 g sampel diekstraksi dan dianalisis dengan HPLC. Kemudian di ekstraksi kembali dengan menimbang 20 g sampel dan ditambah baku sebesar 80%, 100%, dan 120% dari penimbangan sampel, lalu diinjeksikan kedalam sistem HPLC dan di replikasi sebanyak 3 kali pada masing-masing penambahan baku. Nilai akurasi dinyatakan sebagai % *recovery*.

LOD (Limit of Detection) dan LOQ (Limit of Quantification)

Larutan standar dengan seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 dan 120 µg/mL diinjeksikan kedalam sistem HPLC. Kemudian dibuat kurva hubungan antara konsentrasi dengan AUC dan diperoleh persamaan regresi linier $y = bx + a$, dan dihitung nilai LOD dan LOQ.

$$LOD = 3 \frac{SD}{b} \quad \text{dan} \quad LOQ = 10 \frac{SD}{b} \quad (\text{Harmita, 2004})$$

Analisis Kuantitatif

Penyiapan larutan stok

Standar teobromin dibuat dengan konsentrasi 1,0 mg/mL. Selanjutnya disonikasi.

Pembuatan kurva baku

Seri larutan baku yang dibuat 20, 40, 60, 80, 100, dan 120 µg/mL Masing-masing larutan seri baku teobromin disaring menggunakan *millipore* kemudian diinjeksikan ke sistem HPLC.

Penetapan kadar teobromin

Sampel yang diperoleh dilarutkan dalam metanol ad 10 ml dan disonikasi kemudian diinjeksikan sebanyak 20 µL ke dalam sistem HPLC.





3. HASIL DAN PEMBAHASAN





Uji kualitatif untuk membuktikan adanya teobromin dalam sampel dilakukan dengan reagen Parry menghasilkan warna larutan hijau, Uji Murexide menunjukkan menghasilkan warna merah violet (Tabel 2) dan perbandingan waktu retensi antar sampel dan standard. Hasil uji parry, moreksid dapat dilihat pada Tabel 1, sedangkan waktu retensi dapat dilihat pada Gambar 1. Uji Parry untuk memunjukkan adanya alkaloid teobromin merupakan salah satu jenis alkaloid xantin. Uji Murexide ini merupakan salah satu uji kualitatif yang spesifik untuk alkaloid turunan xantin. Waktu retensi merupakan waktu yang diperlukan suatu analit untuk bergerak dari awal kolom ketika sampel diinjeksikan sampai keluar dari kolom dan terdeteksi oleh detektor (Mulja dan Suharman, 1995). Senyawa teobromin juga dapat diidentifikasi menggunakan instrumen HPLC dengan cara membandingkan t_R antara standar teobromin dengan sampel yang diduga mengandung teobromin.

Validasi metode analisis dilakukan untuk memastikan bahwa metode yang digunakan sudah memenuhi kriteria kesesuaian yang meliputi kesesuaian system, linieritas, presisi, akurasi, LOD, LOQ. Dari hasil penelitian menunjukkan kesesuaian system diperoleh nilai % RSD dari tailing Factor sebesar $1,9562\% < 5\%$, AUC sebesar $3,5067\% < 5\%$, nilai lempeng $1776,6350 \geq 1000$ dan nilai resolusi $2,85202 \geq 2$. Hal ini memenuhi syarat hal ini senada dengan yang dilakukan oleh Yunita(2012). Hasil linieritas menunjukkan nilai $r^2=0,9997$, Presisi dengan menggunakan konsentrasi baku 20 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, dan 100 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh nilai RSD secara berturut-turut yaitu 1,7323%, 1,0175%, dan 1,0866% dimana hasil tersebut menunjukkan nilai $<5\%$ dan memenuhi persyaratan presisi yang baik. Akurasi menyatakan ukuran kedekatan nilai hasil yang diperoleh dengan nilai yang sesungguhnya. Uji akurasi ini dilakukan dengan penambahan baku sebesar 80%, 100%, dan 120% kedalam sampel dan direplikasi sebanyak 3 kali dengan nilai \bar{x} recovery berturut turut 99,0223; 84,9771; 76,8150. Kriteria % recovery yang diperbolehkan untuk kadar 10 $\mu\text{g/ml}$ adalah 80-110%, untuk 100 $\mu\text{g/ml}$ adalah 90-107% (AOAC dalam Gonzales dan Herrador, 2007). Menurut Yunita, (2012) % recovery untuk kadar 30 $\mu\text{g/ml}$ adalah 82,2-109,3%. Berdasarkan hasil di atas diketahui bahwa akurasi kadar untuk penambahan baku 80% dan 100% berada pada rentang 82,2%-109,3%, artinya telah memenuhi persyaratan, sedangkan untuk penambahan baku 120% memiliki nilai akurasi kurang dari 82,2%, yang artinya tidak memenuhi persyaratan. Hasil LOD menunjukkan bahwa konsentrasi terkecil yang masih dapat dideteksi adalah pada konsentrasi 254,9585 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan untuk konsentrasi terkecil yang masih memenuhi kriteria akurasi dan presisi adalah pada konsentrasi 849,8617 $\mu\text{g/ml}$.


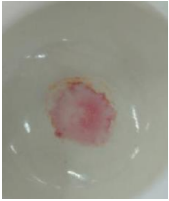

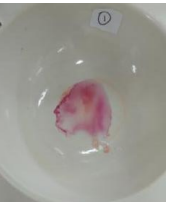




Penetapan kadar teobromin dengan HPLC dilakukan pada bubuk minuman coklat. Metode ini dipilih karena memiliki beberapa kelebihan, yaitu mudah, cepat, serta memiliki selektivitas yang tinggi. HPLC yang bersifat selektif menjadi salah satu poin penting, dikarenakan sampel yang digunakan pada penelitian ini yang merupakan campuran, sehingga diperlukan metode analisis yang dapat memisahkan teobromin dari campuran senyawa lainnya. Sistem HPLC yang digunakan pada penelitian ini adalah fase diam C18 yang bersifat non polar, dan fase geraknya adalah campuran metanol : akuabides (40:60) yang bersifat lebih polar dari fase diamnya. Metanol digunakan sebagai campuran fase gerak karena senyawa teobromin memiliki kelarutan yang baik dalam pelarut alkohol, selain itu metanol memiliki viskositas yang tidak terlalu tinggi jika dibandingkan pelarut alkohol lainnya, sehingga tekanan pompa yang dihasilkan juga tidak terlalu tinggi, dimana tekanan pompa yang tinggi dapat memperpendek umur kolom, maka selama proses analisis tekanan pompa dijaga serendah mungkin (Yunita, 2012). Hasil rata-rata kadar teobromin per takaran untuk satu *cup* minuman coklat pada sampel 1 sebesar $(18,0443 \pm 0,8298)$ mg, sampel 2 sebesar $(21,1753 \pm 0,8716)$ mg, dan pada sampel 3 sebesar $(32,1292 \pm 1,4765)$ mg. Nilai RSD pada masing-masing sampel berturut-turut adalah 4,5988%, 4,1161%, dan 4,5957%, ketiga sampel tersebut memiliki nilai RSD $<5\%$ yang menunjukkan bahwa hasil perhitungan dari ketiga sampel tersebut dapat diterima.

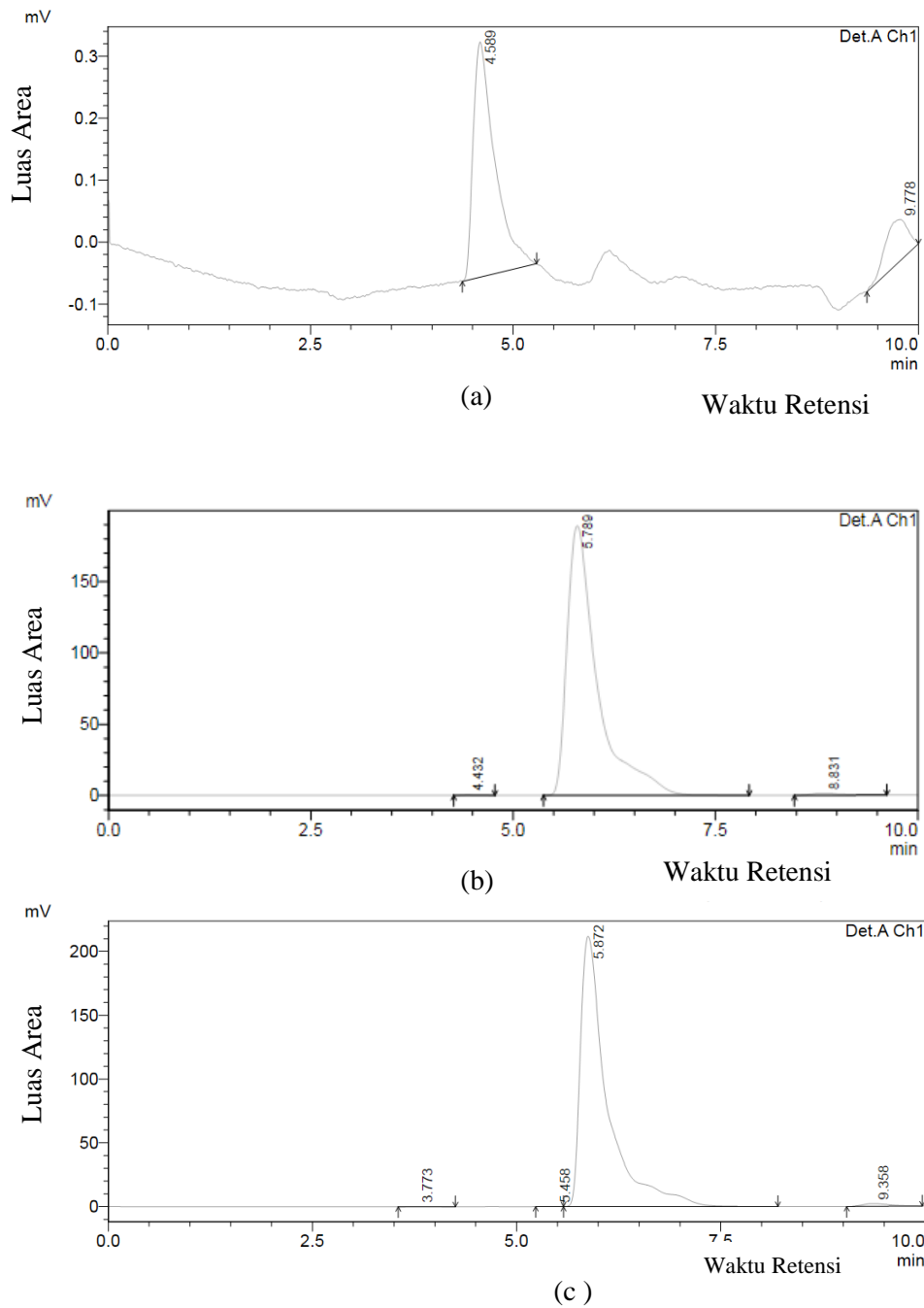
Tabel I. Hasil Uji Parry

Sampel Uji	Gambar		Hasil	Keterangan
	Sebelum	Sesudah		
Standar			Hijau	Positif
Sampel 1			Hijau	Positif

Sampel 2			Hijau	Positif
Sampel 3			Hijau	Positif

Tabel 2. Hasil Uji Murexide

Sampel uji	Gambar		Hasil	Keterangan
	Sebelum	Sesudah		
Standar			Merah violet	Positif
Sampel 1			Merah violet	Positif
Sampel 2			Merah violet	Positif
Sampel 3			Merah violet	Positif



Gambar 1. (a) Kromatogram Pelarut, (b) Kromatogram Standar Teobromin (c) Kromatogram Sampel Bubuk Cokelat. Fase Gerak Metanol:Akuabides (40:60 v/v), Fase Diam C18 (250x4,6 mm, Detektor UV 275 nm, Flowrate 0,8 mL/menit

4. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sampel bubuk minuman coklat yang beredar di Kecamatan Umbulharjo mengandung teobromin dengan kadar rata-rata teobromin yang terkandung pada sampel 1, sampel 2, dan sampel 3 berurut-turut adalah $(18,0433 \pm 0,8298)$ mg, $(21,1753 \pm 0,8716)$ mg, dan $(32,1292 \pm 1,4765)$ mg per takaran untuk satu cup minuman coklat.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dan mendukung selama proses penelitian hingga pembuatan naskah publikasi ini selesai.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Alvi, S. N., dan Hammami, M., 2011, Validated HPLC Method for Determination of Caffeine Level in Human Plasma Using Synthetic Plasma : Application to Bioavailability Studies. *Journal Chromatogr. Sci*, 292-296.
- Anonim, 2006. *The United State Pharmacopeia*, 29th Ed., 3050-3053, United State Pharmacopeia Convention Inc., Rockville Harmita., 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3) : 117-135
- Czech, K., Johnson, A., and Rodeberg, N., 2011, Simultaneous Determination Of Caffeine And Theobromine In Local Area Coffee Brews, *Concordia College Journal of Analytical Chemistry*, 2 : 17–22.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Junaidi, L., Sudibyo, A., and Hendarti., 2007, Penelitian Ekstraksi Theobromine Dari Biji Kakao, *Jornal of Agro-Based Industry*, 24(1) : 9-20.
- Kuncoro, B., Maghfiroh, R.C., and Rochmat, A., 2014, Uji Kesesuaian Kromatografi Cair Kinerja tinggi Fase Terbalik Pada Bahan Baku Parasetamol, *Farmagazine*, 1(2) : 35-41
- Lim, T.K., 2012, *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants, Fruits*, Springer Science Business Media B.V.
- Maramis, R. K., Citraningtyas, G., Wehantouw, F., 2013, Analisa Kafein dalam Kopi Bubuk di Kota Manado Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*, Vol 2(4) : 122-128
- Marliana, S. D., Suryanti, V., Suyono., 2005, Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Schiumedule Jacq. Swartz.*) dalam Ekstrak Etanol, *Biofarmasi*, 3(1) : 26-31
- Meng, C. C., Jalil, A. M. M., and Ismail, A., 2009, Phenolic and Theobromine Contents of Commercial Dark, Milk, and White Chocolates on The Malaysia Market, *Molecules*, 14 (1) : 200-209.
- Pavia, D., 1973, Coffee, Tea, or Cocoa, A Trio of Experiments Including The Isolation of Theobromine from Cocoa, *J. Chem*, 50(11) : 791–792.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Contreras-Ramos, S. M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., and Lugo-Cervantes, E., 2012, Effect Of Fermentation Time And Drying Temperature On Volatile Compounds In Cocoa. *Food Chemistry*. (132) : 277-288.
- Tarigan, E. Y., 2012, Optimasi dan Validasi Metode Analisis Rabeprazol dalam Plasma In Vitro secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Jakarta
- Yunita, M. S. R., 2012, Validasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fase Terbalik Pada Penetapan Kadar Kafein Dan Teobromin Dalam Cokelat Bubuk Merk “X”, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.