BAB 3

PELAKSANAAN PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Riset dan Standarisasi Industri Palembang, Sumatera Selatan. Penelitian ini akan dimulai pada bulan September 2019 sampai dengan Oktober 2019.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : 1) AAS (merk "*Mizu*" tipe AA 200, China), 2) alat-alat gelas, 3) batu didih, 4) cawan analisa, 5) HPLC (merk "*Shimadzu"* tipe LC-20, Japan), 6) huller (merk *Super Quick*, Indonesia), 7) *grinder* (merk "*Latian Goon"*, Taiwan), 8) kertas saring ("whatman" tipe 540, Indonesia), 9) magnetic stirrer (merk **"***Argo LAB*" tipe M2-D PRO, Italia)**,** 10) neraca analitik,11) oven listrik, 12) penangas air (merk "*B-ONE*" tipe DWBC-10, China), 13) sangrai *(merk "william Coffee Roaster",* Indonesia), dan 14) Sekop (merk "*Kenmaste*", Indonesia).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : 1) aquabidest, 2) biji kopi luwak liar 3) buffer H_3PO_4 20 mm, 4) H_2O_2 18N, 5) HNO_3 7N, 6) $HClO_4$, 7) magnesium nitrat, 8) natrium molibdat 2%, 9) Pb asetat 115g, 10) PbO 60g, dan 11) standar kafein.

3.3. Metode Penelitian

1. Analisa Fisik

Analisa fisik dilakukan pada biji kopi luwak kering sebelum disangrai, adapun parameter yang diuji adalah

A. Panjang, lebar, tebal biji kopi untuk mengetahui ukuran varietas biji kopi arabika dan robusta Segamit

B. Cacat fisik pada biji kopi luwak sesuai SNI 01-2907-2008 untuk mengetahui mutu biji kopi luwak Segamit. Biji kopi yang digunakan pada saat penelitian hasil sortasi premium.

C. Densitas kamba biji kopi luwak untuk mengetahui keringkasan biji kopi dalam menepati suatu volume.

2. Perlakuan Sangrai

Perlakuan sangrai dilakukan pada biji kopi luwak kering untuk menghasilkan cita rasa pada kopi luwak, sehingga dapat diolah lebih lanjut menjadi kopi bubuk. Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAKF) dengan dua faktor perlakuan, yaitu (Faktor A) suhu yang digunakan saat sangrai yang terdiri dari 3 taraf perlakuan dan (Faktor B) lama waktu sangrai yang terdiri dari 3 taraf. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga dihasilkan 27 kombinasi perlakuan. Perlakuan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

Faktor A = Suhu Sangrai

A_1 = 190˚C

A_2 = 200˚C

A_3 = 210˚C

Faktor B = Lama Waktu Sangrai

B_1 = 8 menit

B_2 = 10 menit

B_3 = 12 menit

Parameter yang diamati untuk uji kimia yang dilakukan pada biji kopi luwak sebelum disangrai meliputi kadar air. Analisa organoleptik pada sampel dilakukan dengan menggunakan metode uji *cupping*. Uji *cupping* terdiri dari *quality of aroma, intensity of aroma, quality of flavour, insensity of flavour, body, acidity, quality of aftertaste*. Data yang diperoleh akan diolah menggunakan analisis keragaman (ANOVA). Perlakuan yang berpengaruh nyata akan diuji lanjut menggunakan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) pada taraf 5 %, untuk menentukan perlakuan terbaik.

3. Uji Standar Nasional Indonesia (SNI)

Perlakuan terbaik dari poin 2 dilakukan uji menurut Standar Nasional Indonesia (SNI). Parameter yang diuji adalah kadar air, kadar abu, kealkalian abu, sari kopi, kadar kafein, densitas kamba, dan uji cemaran logam (timbal, seng, tembaga, raksa, dan arsen).

3.4. Cara Kerja

Prosedur kerja yang dilakukan pada penelitian ini menganalisa kopi bubuk luwak yaitu pembuatan sampel kopi bubuk, cara pembuatan ekstrak kopi bubuk, analisa fisik, analisa kimia, dan uji *cupping*.

3.4.1. Proses Pembuatan Sampel Kopi Luwak Bubuk (*Civet Coffee*)

Pembuatan sampel kopi luwak bubuk (*Civet coffee*) berdasarkan (*Specialty Coffee Association of America*) SCAA, (2018), untuk densitas kamba, kadar air, kadar abu, kealkalian abu, kafein, dan cemaran logam dilakukan dengan cara :

1. Biji kopi luwak diambil dari kebunnya yang dilakukan oleh petani setempat. Kebun kopi tersebut terletak di desa Segamit, Kabupaten Muara Enim, Sumatera Selatan. Biji kopi yang diambil adalah kopi luwak liar.
2. Biji kopi luwak liar dicuci kemudian dijemur sampai kadar air dibawah 12,5% bb oleh petani, kemudian dibawa ke kantor Badan Standarisasi Nasional, Palembang
3. Sampel biji kopi luwak diambil sebanyak 420 g untuk disangrai menjadi kopi bubuk dengan suhu yang digunakan sesuai perlakuan yaitu 190˚C, 200˚C, dan 210˚C dan waktu 8 menit, 10 menit, 12 menit.
4. Sangrai diulang sebanyak 3 kali pengulangan sesuai perlakuan.
5. Biji kopi luwak yang telah disangrai kemudian digiling terlebih dahulu.
6. Biji kopi digiling pada tingkat kehalusan medium. Menurut Sya*h et al.,* (2013), ukuran partikel bubuk kopi pada tingkat kehalusan medium adalah 60 mesh.

3.4.2. Proses Pembuatan Ekstrak Kopi Luwak (*Civet Coffee*)

Proses pembuatan ekstrak kopi luwak untuk parameter uji *cupping* dan uji sari kopi yang dilakukan dengan metode penyeduhan secara manual, yaitu sajian tubruk. Proses pembuatan sampel ekstrak kopi luwak dilakukan dengan

penyeduhan tubruk menurut SCAA (*Specialty Coffee Association of America*). (2018), sebagai berikut :

1. Bubuk kopi ditimbang sebanyak 8 g sesuai perlakuan kemudian diekstrak menggunakan metode penyeduhan manual tubruk.
2. Air ditambahkan sebanyak 150 mL untuk sampel dengan suhu 90°C. Air yang digunakan harus bersih, tidak berbau dan tidak air destilasi. Menurut (*Specialty Coffee Assosiation of America)* SCAA (2018), suhu penyeduhan untuk *cupping* atau menyajikan kopi arabika dan robusta yang paling optimal adalah pada suhu 90°C. Air yang digunakan untuk penyeduhan kopi adalah air yang mengandung mineral (Sage, 2015).

3.5. Parameter Fisik

Analisa fisik dilakukan pada sampel biji kopi luwak kering adapun parameter yang diuji adalah :

3.5.1. Identifikasi Panjang dan Lebar pada Biji Kopi Luwak (*Civet Coffee*)

Identifikasi biji kopi luwak untuk mengetahui panjang, tebal, dan lebar menurut Standar Nasional Indonesia, (2008) sebagai berikut :

1. Sampel kopi luwak dikumpulkan, kemudian direndam pada air bersih selama 10 menit, dengan jumlah air 1 banding 2.
2. Sampel biji kopi luwak dicuci dan dibilas dengan air mengalir sebanyak 3 kali (sampai tidak ada bau tanah dan bau lain selain kopi).
3. Sampel biji kopi luwak dijemur pada sinar matahari langsung selama 2 hari atau sampai kadar air 12%.
4. Sampel biji kopi digiling untuk membuang kulit tanduk dengan alat *huller*.
5. Sampel biji kopi luwak diambil sebanyak 40 g, kemudian diukur panjang dan lebar biji kopi dengan alat jangka sorong.

3.5.2. Uji Cacat Fisik pada Biji Kopi Luwak (*Civet Coffee*)

Identifikasi biji kopi luwak untuk mengetahui cacat fisik menurut Standar Nasional Indonesia, (2008) sebagai berikut :

1. Sampel biji kopi luwak diambil sebanyak 300 g.

2. Sampel biji Kopi Luwak disortasi berdasarkan acuan Standar Nasional Indonesia 01-2907-2008.

3.5.5. Uji Densitas Kamba Biji Kopi

Densitas kamba dihitung dengan mengacu kepada Singh *et al.*, (2011) yang dimodifikasi, sebagai berikut :

1. Sebanyak 3 g sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas ukur 10 mL.
2. Sampel dipadatkan dengan diketuk-ketuk pada gelas ukur sehingga tidak terdapat rongga.
3. Densitas kamba dihitung dengan persamaan :

$$\text{Densitas kamba} = \frac{M}{V}$$

Keterangan : M = Berat sampel yang dianalisa (g)

V = Volume sampel yang diamati (mL)

3.6. Parameter Kimia

Analisa kimia dilakukan pada sampel biji kopi luwak kering dan sebelum disangrai adapun parameter yang diuji adalah :

3.6.1. Kadar Air Biji Kopi

Kadar air ditentukan dengan cara pengeringan di dalam oven berdasarkan Standar Nasional Indonesia 01-2891-1992 sebagai berikut untuk *green bean* kopi luwak:

1. Biji kopi luwak ditimbang sebanyak 1 g sampai 2 g dimasukkan pada sebuah cawan Petri kemudian ditimbangan yang bertutup sudah diketahui bobotnya. Sampel dikeringkan pada oven dengan suhu 105˚C selama 3 jam.
2. Cawan Petri diambil dengan penjepit lalu dimasukkan ke dalam desikator untuk didinginkan.
3. Persen kadar air dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kadar Air\% b/b} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} x100\%$$

Keterangan : m_1 = berat cawan dan sampel sebelum dikeringkan, dalam g.

m_2 = berat cawan dan sampel setelah dikeringkan, dalam g.

m_0 = berat cawan, dalam g.

3.6.2. Uji *Cupping*

Standar *cupping* kopi yang sudah disangrai direkomendasikan oleh Komite Statistik dan Standar SCAA meliputi perlengkapan yang diperlukan mulai dari persiapan sangrai, lingkungan dan persiapan *cupping*.

A. Perlengkapan *Cupping*

Cara kerja dalam mempersiapkan perlengkapan *cupping* sebagai berikut :

1. Alat sangrai (*roaster*) dan alat penggiling (*grinder*) dipersiapkan.
2. *Cupping* dilakukan dalam lingkungan yang cukup terang, bersih dan bebas aroma lain yang dapat mengganggu, tersedia meja *cupping*, tenang dan temperatur ruangan yang nyaman.
3. Timbangan, gelas *cupping* dengan tutup, sendok *cupping*, perlengkapan untuk air panas, formulir *cupping*, dan lembar kerja lain dipersiapkan.
4. Gelas *cupping* disiapkan seperti wadah *cupping* yang memiliki volume, dimensi dan bahan pembuat identik yang umumnya terbuat dari *Tempered Glass* atau material keramik dengan daya tampung 207 mL sampai 266 mL dan tutup berdiameter 76-89 mm.

B. Persiapan Sampel

Cara kerja dalam mempersiapkan sampel pada *cupping* sebagai berikut :

1. Biji kopi hijau disangrai sesuai perlakuan dan didiamkan 8-24 jam sebelum *cupping* dilakukan sesuai standar kopi menurut SCAA, (2018).
2. Tingkat penyangraian diukur dalam 30 menit – 4 jam setelah di sangrai sesuai standar penggilingan untuk *cupping* dari SCA dan harus memenuhi syarat berikut dengan toleransi 0,1:

   Agtron "Gourmet": 63.0

   Agtron " Commercial": 48.0

   Colortrack: 62.0

   Probat Colorette 3b: 96.0

   Javalytics: skala pengukuran *Agtron "Gourmet"* atau *"Commercial*"

   Lightells: skala pengukuran *Agtron "Gourmet"* atau *"Commercial*"

   RoastRite: skala pengukuran *Agtron "Gourmet"* atau *"Commercial*"

3. Sampel didinginkan dengan udara, sampai suhu kamar (sekitar 20º C), kemudian sampel disimpan dalam wadah kedap udara pada tempat yang gelap dan sejuk untuk mencegah oksidasi dan kontaminasi. Rasio optimal dalam secangkir kopi 8,25 g kopi (±0,25 gram) per 150 mL air.
4. Sampel digiling selama 15 menit sebelum diinfus dengan air dan diinfuskan tidak lebih dari 30 menit setelah digiling. Ukuran partikel 70% hingga 75% dengan ukuran standar 20 mesh.
5. 5 gelas dari masing-masing sampel disiapkan untuk penilaian keseragaman sampel.
6. Air yang digunakan untuk *cupping* harus bersih dan bebas bau, tetapi tidak disuling atau diencerkan. Total padatan terlarut ideal antara 125-175 ppm, tidak kurang dari 100 ppm atau lebih dari 250 ppm. Temperatur air 93ºC pada saat dituangkan ke kopi bubuk selama 3-5 menit sebelum penilaian.

C. Penilaian Sampel

Cara kerja dalam penilaian sampel pada *cupping* sebagai berikut :

1. Pengujian sensoris dilakukan untuk tiga penilaian, menentukan perbedaan sensoris yang sebenarnya antara sampel, menggambarkan rasa sampel, dan menentukan preferensi produk.
2. *Cupping form* digunakan untuk menilai dan mencatat atribut rasa penting untuk kopi yaitu *fragrance* atau *aroma*, *flavour*, *aftertaste*, *acidity*, *body*, *balance*, *uniformity*, *clean cup*, *sweetness*, *defects*, dan *overall*. Atribut rasa khusus merupakan skor penilaian kualitas positif oleh *cupper*, cacat merupakan skor negatif yang menunjukkan sensasi rasa tidak enak, skor keseluruhan didasarkan pada pengalaman rasa dari *cupper* sebagai penilaian pribadi. Skala kualitas terdiri dari nilai minimum 0 hingga nilai maksimum 10 poin.
3. Prosedur evaluasi dimulai dari pemeriksaan warna sangrai sampel secara visual. Urutan peringkat setiap atribut didasarkan pada perubahan persepsi rasa saat terjadi penurunan suhu kopi saat dingin.

D. *Fragrance* atau Aroma

Cara kerja dalam menilai *fragrance* atau aroma dalam *cupping* sebagai berikut :

1. Skor *fragrance* atau aroma ditandai berdasarkan penilaian kering dan basah.
2. Sampel digiling dengan mengangkat tutup wadah sampel, kemudian aroma bubuk kering sampel dinilai setelah 15 menit sampel digiling.
3. Air dan kerak dibiarkan tidak terputus selama 3 menit sampai tidak lebih dari 5 menit.
4. Pemecahan kerak dilakukan dengan mengaduk 3 kali, kemudian membiarkan busa mengalir ke bagian belakang sendok sambil mengendus perlahan.

E. *Flavour, Aftertaste, Acidity, Body,* dan *Balance*

Cara kerja dalam menilai *flavour*, *aftertaste*, *acidity*, *body*, dan *balance* dalam *cupping* sebagai berikut :

1. Sampel yang telah didinginkan 71º C, dalam waktu sekitar 8-10 menit, dilakukan penilaian minuman.
2. Sampel diminum hingga menutupi area sebanyak mungkin, terutama lidah dan langit-langit atas, karena uap hidung retro berada pada intensitas maksimum pada suhu tinggi ini, *flavour* dan *aftertaste* dinilai pada titik ini. Ketika kopi terus dingin (71º C - 60º C), *acidity*, *body*, dan *balance* dinilai berikutnya. *Balance* adalah penilaian *cupper* tentang seberapa baik kombinasi *flavour*, *aftertaste*, *acidity*, dan *body*.

F. *Sweetness, Uniformity,* dan *Cleanliness*

Cara kerja dalam menilai *sweetness*, *uniformity*, dan *cleanliness* dalam *cupping* sebagai berikut :

1. Penilaian *sweetness*, *uniformity*, dan *cleanl cup* dilakukan saat minuman mendekati suhu kamar (di bawah 37º C). Cupper membuat penilaian pada setiap cup individual, memberikan 2 poin per cangkir per atribut (skor maksimum 10 poin).
2. Penilaian minuman dihentikan ketika sampel mencapai 21º C dan skor keseluruhan ditentukan oleh *cupper* sebagai "*Cupper's Points*" berdasarkan seluruh kombinasi atribut.
3. Semua skor ditambahkan dan skor akhir ditulis pada form penilaian.
4. Skor atribut dicatat sesuai formulir *cupping*, pada beberapa atribut positif, ada dua skala tanda centang.

G. Penilaian Akhir

Cara kerja dalam penilaian akhir sampel dalam *cupping* sebagai berikut :

1. Skor akhir dihitung dengan menjumlahkan skor individu yang diberikan untuk masing-masing atribut utama sebagai skor total.

2. Cacat kemudian dikurangi dari skor total untuk sampai pada skor akhir.

3.7. Parameter Uji Kopi Bubuk Berdasarkan Standar Nasional Indonesia

Perlakuan terbaik dilakukan uji menurut standar Nasional Indonesai (SNI), adapun parameter yang diuji adalah :

3.7.1. Kadar Air

Kadar air ditentukan dengan cara pengeringan di dalam oven berdasarkan Standar Nasional Indonesia 01-2983-1992 sebagai berikut :

1. Kopi bubuk luwak ditimbang sebanyak 1 g sampai 2 g dimasukkan pada sebuah cawan Petri kemudian ditimbangan yang bertutup sudah diketahui bobotnya. Sampel dikeringkan pada oven dengan suhu 105˚C selama 3 jam.
2. Cawan Petri diambil dengan penjepit lalu dimasukkan ke dalam desikator untuk didinginkan.
3. Persen kadar air dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kadar Air\% b/b} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} x100\%$$

Keterangan : m_1 = berat cawan dan sampel sebelum dikeringkan, dalam g.

m_2 = berat cawan dan sampel setelah dikeringkan, dalam g.

m_0 = berat cawan, dalam g.

3.7.2. Kadar Abu

Proses pengabuan zat-zat organik diuraikan menjadi air dan CO^2. Cara kerja dalam penentuan kadar abu berdasarkan Standar Nasional Indonesia 01-2891-1992 sebagai berikut :

1. Kopi bubuk luwak ditimbang sebanyak 2 g sampai 3 g dimasukkan ke dalam sebuah cawan porselen (atau platina) yang telah diketahui bobotnya, untuk sampel cairan diuapkan di atas penangas air sampai kering.

2. Sampel diabukan ke dalam tanur listrik pada suhu 550˚C sampai pengabuan sempurna (sekali-kali pintu tanur dibuka sedikit, agar oksigen bisa masuk).
3. Setelah sampel berwarna putih, cawan porselen diambil dengan penjepit lalu dimasukkan ke dalam desikator untuk didinginkan.
4. Persen kadar abu dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kadar Abu\% b/b} = \frac{W_1 - W_2}{W} x\ 100\%$$

Keterangan : W = bobot sampel dan cawan sebelum diabukan, dalam g.

W_1 = bobot sampel dan cawan setelah diabukan, dalam g.

W_2 = bobot cawan kosong, dalam g.

3.7.3. Kealkalian Abu

Kealkalian abu dapat ditetapkan dengan titrasi asam basa. Cara kerja dalam penentuan kealkalian abu berdasarkan Standar Nasional Indonesia 01-2891-1992 sebagai berikut :

1. Larutan H_2O_2 3% sebanyak 1 tetes - 2 tetes ditambahkan ke dalam abu (dari sisa penetapan abu), catatan: pakai cawan platina untuk pengabuan sampel.
2. Larutan HCl 0,5 N sebanyak 20 mL dimasukkan ke dalam cawan berisi abu tersebut, dipanaskan di atas penangas air selama lebih kurang 10 menit.
3. Abu disaring dan dicuci dengan air panas hingga bebas asam.
4. Hasil saringan dititrasi dengan NaOH 0,5 N, PP digunakan sebagai indikator.
5. Blanko dibuat setelah dilakukan titrasi.
6. Kealkalian abu dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\frac{V_1 - V_2}{W} mL\ N\ NaOH/100$$

Keterangan : W = bobot sampel sebelum diabukan, dalam g.

V_1 = volume yang diperlukan pada penitaran sampel.

V_2 = volume NaOH yang diperlukan pada penitaran blanko.

N = normalitas NaOH.

3.7.4. Penentuan Kadar Timbal, Tembaga, dan Seng

Cara uji camaran logam, timbal, tembaga, dan seng dalam makanan (cara pengabuan kering), dilanjutkan pembacaan absorbansi dengan menggunakan

spektrofotometer serapan atom berdasarkan Standar Nasional Indonesia 01-2896-1998 dengan cara kerja sebagai berikut :

1. Sampel kopi bubuk luwak ditimbang sebanyak 5 g dan dimasukkan ke dalam cawan porselen atau gelas piala 100 mL, ditambahkan 10,0 mL larutan magnesium nitrat dalam etanol, diaduk dengan batang pengaduk. Batang pengaduk diangkat dan dibilasi dengan etanol 95%.
2. Etanol diuapkan di atas penangas air sambil diaduk sekali-sekali, kemudian dipanaskan di atas penangas listrik (gelas piala ditutup dengan kaca arloji).
3. Gelas piala dipindahkan ke dalam tanur dengan suhu 200˚C dan secara bertahap dinaikkan suhu sampai 500˚C selama 2 jam dan diabukan sepanjang malam pada suhu 450˚C sampai 500° C.
4. Gelas piala diangkat dari tanur dan dibiarkan dingin di atas asbes. Apabila masih terdapat sisa karbon, setelah didinginkan ditambahkan 1 mL air dan 2 mL HNO_3, kemudian dikeringkan di atas penangas air, dipanaskan kembali pada suhu 500˚C selama 1 jam.
5. Perlakuan ini diulang sampai diperoleh abu yang berwarna putih.
6. Larutan campuran HCl dan HNO_3 ditambahkan 5 mL ke dalam abu melalui dinding gelas piala dan dipanaskan di atas penangas air sampai abu larut.
7. Larutan HCl , HNO_3, dan abu yang telah dipanaskan dipindahkan sebanyak 100 mL ke dalam labu ukur, kemudian diimpitkan labu dengan air suling dan disaring dengan kertas saring Whatman 540.
8. Blanko dibuat dengan menggunakan pereaksi yang sama.
9. Absorpsi larutan standar, blanko, dan sampel dibaca dengan menggunakan *spektrofotometer* serapan atom pada panjang gelombang 213,9 nm untuk seng, 283,3 nm untuk tembaga, dan 248,3 nm untuk timbal.
10. Kurva kalibrasi dibuat dengan sumbu Y sebagai absorbansi dan sumbu X sebagai konsentrasi (dalam ppm).
11. Kandungan logam dalam sampel dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kandungan logam } (\mu g/g) = \frac{Kg\ Logam/mL\ dari\ kurva\ kalibrasi\ x\ v}{m}$$

Keterangan : v = volume pelarutan, dalam mL.

m = bobot sampel, dalam g.

3.7.5. Penentuan Kadar Raksa

Cara penentuan kadar raksa berdasarkan Standar Nasional Indonesia 01-2896-1998 dengan mereaksikan senyawa raksa dengan $NaBH_4$ atau $SnCI_2$ dalam keadaan asam guna membentuk gas atomik Hg dan diikuti dengan pembacaan absorbansi menggunakan *spektrofotometer* serapan atom tanpa nyala dengan panjang gelombang 253,7 nm.

A. Pengabuan Basah

Cara uji senyawa raksa dalam makanan (cara pengabuan basah), dilanjutkan pembacaan absorbansi dengan menggunakan *spektrofotometer* serapan atom berdasarkan Standar Nasional Indonesia 01-2896-1998 dengan cara kerja sebagai berikut :

1. Sampel kopi luwak bubuk ditimbang sebanyak 5 g kemudian dimasukkan ke dalam labu destruksi, ditambahkan 25 mL H_2SO_4 18 N, 20 mL HNO_3 7 N, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5-6 butir batu didih.
2. Labu destruksi dihubungkan dengan pendingin dan dipanaskan selama 1 jam.
3. Dilakukan pemanasan selama 15 menit.
4. Larutan HNO_3-$HClO_4$ (1:1) sebanyak 20 mL ditambahkan melalui pendingin.
5. Air yang mengalir pada pendingin dihentikan dan dipanaskan dengan suhu tinggi hingga timbal uap berwarna putih. Pemanasan dilanjutkan selama 10 menit, kemudian didinginkan.
6. Air sebanyak 10 mL ditambahkan melalui pendingin sambil labu digoyang-goyangkan.
7. Didihkan kembali selama 10 menit.
8. Pemanas dimatikan dan pendingin dicuci sebanyak 3 kali dengan air suling, didinginkain sampai suhu kamar.
9. Larutan destruksi sampel dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan air suling sampai tanda garis.
10. Blanko dibuat dengan pemakaian pereaksi seperti yang digunakan pada sampel, kemudian disiapkan deret standar.
11. Larutan pereduksi sebanyak 20 mL diambahkan ke dalam larutan deret standar, larutan destruksi, dan larutan blanko.

12. Absorbansi larutan deret standar, larutan destruksi, dan larutan blanko dibaca dengan menggunakan *spektrofotometer* serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm.
13. Kurva kalibrasi dibuat dengan sumbu Y sebagai absorbansi dan sumbu X sebagai konsentrasi (dalam ppm).
14. Kandungan Hg dalam sampel dihitung. Sebagai alternatif, penyiapan sampel dapat dilakukan pengabuan kering dengan alat *microwave digester*.

B. Destruksi Menggunakan *Microwave Digester* dengan Sistem Tertutup

Cara uji raksa selanjutnya yaitu destruksi menggunakan *microwave digester* dengan sistem tertutup, cara kerja sebagai berikut :

1. Sampel kopi bubuk luwak ditimbang sebanyak 1 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung destruksi, ditambahkan 2 mL HNO_3 dan 1 mL H_2O tutup rapat dan dimasukkan ke dalam *oven microwave.*
2. Blanko dibuat dengan pemakaian pereaksi seperti yang digunakan pada sampel kopi bubuk luwak.
3. Larutan deret standar disiapkan.
4. Larutan pereduksi ditambahkan 20 mL ke dalam larutan deret standar, larutan destruksi, dan larutan blanko.
5. Absorbansi larutan deret standar, larutan destruksi, dan larutan blanko dibaca dengan menggunakan *spektrofotometer* serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm.
6. Kurva kalibrasi dibuat dengan sumbu Y sebagai absorbansi dan sumbu X sebagai konsentrasi (dalam ppm).
7. Kandungan Hg dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kandungan raksa } (ppm) = \frac{Kg\ Logam/mL\ dari\ kurva\ kalibrasi\ x\ v}{m}$$

Keterangan : v = volume pelarutan, dalam mL.

m = bobot sampel, dalam g.

3.7.6. Penentuan Kadar Arsen

Cara uji cemaran arsen dalam makanan berdasarkan acuan *AOAC (Official Method 2015.01 Heavy metals in foods)* dan *AOAC (Official Method 2011.19 Application of Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry for the Measurement of Chromium, Selenium, and, Molybdenum in Infant Formula and Adult Nutritional Products),* cara kerja sebagai berikut :

1. Sampel kopi bubuk luwak ditimbang sebanyak 0,5 sampai 1,5 g ke dalam *vessel.*
2. HNO_3 pekat sebanyak 10 mL ditambahkan ke dalam sampel.
3. *Vessel* ditutup dan dimasukkan ke dalam *microwave digestion.*
4. Program *microwave digestion* disesuaikan dengan instruksi pengoperasian alat microwave (Ramp ke suhu 150˚C selama 10 menit, *Hold* pada suhu 150˚C selama 15 menit).
5. Hasil destruksi dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL.
6. Larutan standar campuran Ge, In, Bi, Rh 10 mg/L diambahkan secara terukur sebanyak 0,4 mL, kemudian diencerkan dengan akuabides hingga tanda tera dan dihomogenkan.
7. Larutan disaring dengan filter 0,22 µm.
8. Larutan sampel diukur dalam sistem ICP MS.
9. Kandungan arsen dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kandungan arsen } (ppm) = \frac{\frac{(Aspl-a)}{b} x\ Vx\ fp}{\text{Wspl atau Vspl}}$$

Keterangan : A.spl = Rasio sampel terhadap internal standar

a = Intercept dari kurva kalibrasi standar

b = Slope dari kurva kalibrasi standar

Fp = Faktor pengenceran sampel

V = Volume labu akhir sampel (mL)

W spl = Bobot penimbangan sampel (gram)

Vspl = Volume pemipetan sampel (mL)

3.7.7. Sari Kopi

Proses ekstraksi kopi dalam air, cara kerja dalam penentuan sari kopi berdasarkan Standar Nasional Indonesia 01-3542-2004 sebagai berikut :

1. Sampel kopi luwak bubuk ditimbang sebanyak 2 g.
2. Sampel dimasukkan ke dalam gelas piala 500 mL.
3. Sampel ditambahkan 200 mL air mendidih, diamkan selama 1 jam.
4. Larutan sampel disaring ke dalam labu ukuran 500 mL, dibilas dengan air panas sampai larutan berwarna jernih.
5. Larutan dibiarkan sampai suhu kamar, ditambahkan air dan ditepatkan sampai tanda garis.
6. Sebanyak 50 mL larutan dimasukkan ke dalam pinggang porselin yang telah diketahui bobotnya.
7. Larutan sampel dipanaskan di atas penangas air sampai mengering, kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105˚C selama 2 jam.
8. Larutan sampel didinginkan dalam desikator dan ditimbang bobot tetap.
9. Persen sari kopi dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ sari kopi} = \frac{W^1 x 500}{W^2 x 50} x\ 100\%$$

Keterangan : W_1 = bobot ekstrak.

W_2 = bobot sampel.

3.7.8. Penentuan Kadar Kafein

Penetuan kadar kafein dengan pengukuran menggunakan HPLC berdasarkan Standar Nasional Indonesi nomor 01-3542-2004 dilakukan dengan berbagai cara, diantaranya adalah pembuatan larutan standar, pembuatan larutan Pb-asetat, pembuatan larutan uji, dan persiapan fase gerak. Penentuan kadar kafein pada sampel dengan acuan *AOAC (Official Methods of Analysis)* 1995.

A. Pembuatan Larutan Induk

Pembuatan larutan induk kafein dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Standar kafein ditimbang sebanyak 0,125 g.
2. Standar kafein dilarutkan dengan etanol absolut dan aquades filter dengan perbandingan (1:4) ke dalam labu ukur 250 mL.

B. Pembuatan Larutan Standar

Pembuatan larutan induk kafein dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Larutan induk sebanyak 2 mL, 5mL, dan 10 mL masing- masing dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL yang berbeda.
2. Aquadest dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL sampai tanda garis.

C. Pembuatan Larutan Pb-asetat

Pembuatan larutan Pb-asetat dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Pb-asetat ditimbang sebanyak 115 g dan PbO ditimbang sebanyak 60 g.
2. Larutan Pb-asetat dan PbO dilarutkan dengan aquades ke dalam labu ukur sebanyak 500 mL sampai semua PbO larut dan terbentuk larutan berwarna putih keruh.

D. Pembuatan Larutan Uji Kafein

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Sampel kopi bubuk luwak ditimbang sebanyak 1 g dimasukkan kedalam Erlenmeyer 100 mL.
2. Sampel dilarutkan dengan aquades sebanyak 40 mL dan ditambahkan 1 mL Pb asetat.
3. Larutan aquades sebanyak 40 mL yang ditambahkan 1 mL Pb asetat dipanaskan selama 15 menit, kemudian didinginkan pada suhu kamar.
4. Setelah dingin dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dengan menggunakan corong dan Erlenmeyer dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali.
5. Filtrat diambil sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam 50 mL labu ukur dan ditambahkan aquades sampai tanda garis.
6. Filtrat disaring dengan menggunakan *syringe* dengan *membrane filter* ke dalam tabung reaksi.

E. Persiapan Fase Gerak

Persiapan fase gerak dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. *Solvent* yang digunakan sebagai fase gerak untuk pemeriksaan kadar kafein dengan alat HPLC adalah 70% aquades filter dan 30% methanol.

2. *Solvent* harus difilter terlebih dahulu menggunakan vakum filter dengan *membrane filter* (*pore size : 0,45 µm diameter 47 mm*) sebelum digunakan untuk pemeriksaan.
3. Larutan standar maupun larutan uji masing-masing sebanyak 10 µl diinjeksikan dengan menggunakan *syringe* 50 µl ke alat HPLC, dimana kondisi alat HPLC pada saat analisa sebagai berikut :

Kolom	: *Hypersil* ODS C 18,5 UM, 100 x 4,6 mm
Fase gerak	: Aquades filter, methanol (70% : 30%)
Kecepatan aliran	: 0,75 mL/menit
Temperatur	: 35˚C
Detektor	: VWD dengan UV 272 nm

Kadar kafein pada sampel diperoleh dari perbandingan kromatografi standar dengan kromatografi sampel yang diperoleh.

3.7.9. Uji Densitas Kamba Kopi Bubuk

Perlakuan terbaik dilakukan uji densitas kamba kopi bubuk, dihitung dengan mengacu kepada Singh *et al.*, (2011) yang dimodifikasi, sebagai berikut :

1. Sebanyak 3 g sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas ukur 10 mL.
2. Sampel dipadatkan dengan diketuk-ketuk pada gelas ukur sehingga tidak terdapat rongga.
3. Densitas kamba dihitung dengan persamaan :

$$\text{Densitas kamba} = \frac{M}{V}$$

Keterangan : M = Berat sampel yang dianalisa (g)

V = Volume sampel yang diamati (mL)